

Untersuchungen zur Epidemiologie von Vancomycin-resistenten Enterokokken
bei hospitalisierten und nicht hospitalisierten Personen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von J ö r n T r e u s t e d t
aus N e u e n h a u s

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Institut für Medizinische Mikrobiologie
des Universitätsklinikums Gießen
Leiter: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachterin: Frau PD Dr. R. Füssle
Gutachter: Herr Prof. Dr. T. Eikmann

Tag der Disputation: 30.05.2003

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Patienten, Material und Methoden	7
2.1	Untersuchte Personen	7
2.1.1	Nicht hospitalisierte Personen	7
2.1.2	Patienten des Universitätsklinikums Gießen	7
2.2	Untersuchungsmaterial	8
2.3	Statistische Methoden	9
2.4	Isolierung und Identifizierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken	9
2.4.1	Material für die Isolierung und Identifizierung	9
2.4.2	Methodik der Isolierung und Identifizierung	12
2.5	Resistenztestung	13
2.5.1	Agardiffusionstest	13
2.5.2	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	14
2.5.3	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Mikrodilution	14
2.5.4	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Etest	17
2.6	Nachweis des Resistenzgens vanA mittels Polymerase-Kettenreaktion	18
2.6.1	Material für die Polymerase-Kettenreaktion	18
2.6.2	Methodik der Polymerase-Kettenreaktion	21
2.7	Genotypisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese	24
2.7.1	Material für die Genotypisierung	25
2.7.2	Methodik der Genotypisierung	27
3	Ergebnisse	30
3.1	Kolonisationsraten und Einflussfaktoren	30
3.2	Speziesidentifizierung	33
3.3	Nachweis des Resistenzgens vanA	33
3.4	Resistenzprofil	35
3.4.1	Resistenz gegen Glykopeptide	35
3.4.2	Resistenz gegen andere Antibiotika	36
3.5	Untersuchungen zur Verwandtschaft der Isolate	40
3.5.1	Kinderklinik	45
3.5.2	Medizinische Klinik, Nephrologie	45
3.5.3	Medizinische Klinik Seltersberg, Onkologie	46
3.5.4	Verwandte Isolate in verschiedenen Bereichen des Klinikums	46
4	Diskussion	48
5	Zusammenfassung	56
6	Literaturverzeichnis	57

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Centers for Disease Control
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
iv	intravenös
KbE	Kolonie-bildende Einheit
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin-resistente Staphylococcus aureus
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Pat.	Patient
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
rpm	rounds per minute
Tab.	Tabelle
TSB	Tryptic Soy Broth
vanA	Vancomycin-Resistenz-Gen Typ A, kodiert für das Protein VanA
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin-resistente Staphylococcus aureus
ZVK	Zentraler Venenkatheter

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Abbildung	Seite
1.1	Vancomycinverbrauch des Gießener Universitätsklinikums	-5-
3.1	Gelelektrophoretische Darstellung des vanA-Gens nach PCR	-34-
3.2	Empfindlichkeit aller 70 VRE-Isolate aus Stuhl und anderem klinischen Untersuchungsmaterial gegen verschiedene Antibiotika	-39-
3.3	DNA-Fragmentprofil von 7 E. faecium-Isolaten nach SmaI-Restriktionsverdau und PFGE	-43-
3.4	DNA-Fragmentprofil von 9 E. faecium-Isolaten nach SmaI-Restriktionsverdau und PFGE	-44-

Tabellenverzeichnis

Nr.	Tabelle	Seite
2.1	Patientendaten	-8-
2.2	Minimale Hemmkonzentration: Grenzwerte der Empfindlichkeit für Enterokokken nach NCCLS	-15-
2.3	Verteilung der Antibiotikakonzentrationen in µg/ml in den Mikrotiterplatten für das Mikrodilutionsverfahren	-16-
2.4	Cycler-Programm für die PCR	-22-
3.1	VRE-Kolonisationsraten und Häufigkeit der Vancomycintherapie bei hospitalisierten und nicht hospitalisierten Personen	-30-
3.2	Verteilung der kolonisierten und nicht kolonisierten Patienten im Klinikum nach möglichen Risikofaktoren; Irrtumswahrscheinlichkeit im Chi-Quadrat-Test	-31-
3.3	Ergebnisse der logistischen Regression von Vancomycintherapie, Cephalosporintherapie, sonstiger Antibiotikatherapie und Grunderkrankung auf die Kolonisation mit VRE	-32-
3.4	Zuordnung der Enterokokkenspezies zu ihrer Quelle und dem nachgewiesenen Resistenzgen	-33-
3.5	Anteil der Isolate mit nachgewiesenem vanA-Gen aufgeschlüsselt nach ihrer Quelle	-34-
3.6	Vergleich der In-vitro-Aktivitäten verschiedener Antibiotika gegen vanA-positive und vanA-negative VRE-Isolate	-35-
3.7	Empfindlichkeitsverteilung der einzelnen Enterokokkenspezies gegen verschiedene Antibiotika	-36-
3.8	Empfindlichkeit gegen Chloramphenicol und Dalfopristin/Quinupristin derjenigen VRE, die gegen alle anderen getesteten, systemisch verabreichbaren Antibiotika resistent waren	-37-
3.9	Empfindlichkeit der VRE-Isolate gegen verschiedene Antibiotika	-38-
3.10	Verteilung der 8 Bandenmuster-Typen A-H von Enterococcus faecium über die Bereiche des Klinikums in unterschiedlichem Probenmaterial; Nachweis des vanA-Gens und Angaben zur vorherigen Therapie mit Vancomycin	-41-
3.11	Verteilung der unterschiedlichen Bandenmustertypen über die Bereiche des Klinikums und Bandenmustertypen der Isolate von nicht hospitalisierten Personen; Nachweis des vanA-Gens und Angaben zur vorherigen Therapie mit Vancomycin	-42-

1 EINLEITUNG

Die Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika stellt in der Behandlung von Infektionen ein stetig wachsendes Problem dar. Besonders schwerwiegend ist diese Entwicklung im Bereich der grampositiven Bakterien. Zu den Problemkeimen, die multiple Resistenzen gegen Breitbandpenicilline, Cephalosporine, Aminoglykoside und Glykopeptide aufweisen, gehören die Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), auch als Glykopeptid-resistente Enterokokken (GRE) bezeichnet.

Die Verbreitung dieser multiresistenten Erreger hat in den 90er Jahren weltweit stark zugenommen. In den USA stieg die Resistenzrate von Enterokokken gegenüber Vancomycin bei nosokomialen Infektionen auf Normalstationen von 0,3% (1989) über 7,9% (1993) auf 15% (1997), auf Intensivstationen im gleichen Zeitraum von 0,4% über 13,6% auf 23%, in einigen Bereichen bis 42% (37, 89). Auch aus anderen Ländern wird von ähnlichen Entwicklungen berichtet. So waren 1998 in England und Wales 24% aller *E. faecium*-Stämme resistent gegen Vancomycin, während es 1993 noch 6,3% gewesen waren (63, 89). Die Häufigkeit von VRE ist in Deutschland bislang geringer: Eine deutsche Multicenterstudie in den Jahren 1996/1997 ergab bei klinischen Isolaten eine Glykopeptidresistenzrate bei *E. faecium* von 12%, bzw. bei allen Enterokokken-Isolaten von 4,3% (74).

Auch bei Patienten des Universitätsklinikums Gießen traten Infektionen mit VRE auf. Insbesondere bei Dialyse- und Intensivpatienten wurden solche Keime aus Urin und Trachealsekret isoliert. Ausgangsquelle für die jeweilige Infektion ist in der Regel die Stuhlflora der Patienten. Die intestinale Kolonisation mit VRE wird von vielen Autoren als Voraussetzung für die Entwicklung einer Infektion beschrieben (23, 24, 49, 59). Symptomlose Keimträger stellen außerdem ein bedeutendes Reservoir dar, das unbemerkt zur Verbreitung von VRE beitragen kann (23).

Enterokokken sind grampositive, in Ketten liegende, katalasenegative, fakultativ anaerobe Kokken. Sie gehören zur Familie der Streptococcaceae und wurden früher zu den Streptokokken gezählt (Serogruppe D nach Lancefield). Seit 1984 bilden sie eine eigene Gattung (21, 33, 61).

Enterokokken sind Teil der physiologischen Darmflora von Mensch und Tier, können aber außerhalb ihres natürlichen Standortes Krankheiten verursachen (61, 75). Im Vordergrund stehen Harnwegsinfektionen und Peritonitis, seltener sind eitrige Wundentzündungen und Sepsis. Auch ca. 10% der Endokarditiden werden durch Enterokokken verursacht (40, 50, 75, 81, 85). Enterokokken werden bei 12-14 % aller Krankenhausinfektionen isoliert, wobei es sich zu etwa 90% um *E. faecalis* und zu etwa 10% um *E. faecium* handelt, während andere der 17 bisher bekannten Enterokokken-Spezies nur sehr selten vorkommen (3, 33, 37, 85).

Die Therapie von Enterokokkeninfektionen erfolgt in der Regel mit Aminopenicillinen. Bei Endokarditis ist die Kombination mit einem Aminoglykosid sinnvoll. Bei Allergien oder Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika sind Makrolide oder Glykopeptide Mittel der Wahl (40, 46, 84, 85).

Seit vielen Jahren nimmt die Resistenz von Enterokokken gegen unterschiedliche Antibiotika stetig zu. Die zuerst aufgetretenen Resistenzen richteten sich gegen Aminoglykoside. In den 60er Jahren tauchten Stämme mit Hochresistenz gegen Streptomycin auf, es folgte Ende der 70er Jahre die Resistenz gegen Gentamicin. Seit Anfang der 80er Jahre werden Resistenzen gegen Breitbandpenicilline sowie gegen Tetracycline, Makrolide, Lincosamide, Chloramphenicol und ältere Chinolone beobachtet (40, 75). Enterokokken weisen zudem eine natürliche Resistenz gegen Cephalosporine auf. Der breite Einsatz dieser Antibiotika in den Kliniken führte zu einem Selektionsvorteil für Enterokokken (37, 73, 74). Die Resistenz gegen Glykopeptide ist ein weiteres Problem. Zum ersten Mal wurde im Jahre 1988 von Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) berichtet, die selbst durch dieses Reserveantibiotikum nicht mehr wirkungsvoll bekämpft werden konnten (31, 41).

Zu den Glykopeptidantibiotika zählen Vancomycin und Teicoplanin. Sie sind gegen die meisten grampositiven Bakterien gut wirksam. Gegen gramnegative Bakterien haben Glykopeptidantibiotika keine Wirkung, da sie zu groß sind, um die äußere Membran gramnegativer Bakterien zu durchdringen (83).

Vancomycin wird von *Streptomyces orientalis* produziert. Es wurde 1956 unter dem Druck des vermehrten Auftretens Penicillinase-produzierender *Staphylococcus aureus*-Stämme entwickelt (17, 61). Es hemmt den Zellwandaufbau grampositiver Bakterien, indem es an das D-Alanyl-D-Alanin-Ende des Pentapeptidanteils des Peptidoglykans bindet, aus dem die Zellwände der Bakterien bestehen. So wird die Peptidoglykansynthese sterisch behindert (17, 83).

Teicoplanin ist ein neueres Glykopeptidantibiotikum, das erst seit 1989 zur Verfügung steht. Die Substanz kann aus Kulturen von *Actinoplanes teichomyceticus* gewonnen werden und stellt ein Gemisch aus bis zu 6 komplexen Glykopeptiden dar. Der Wirkungsmechanismus und das Wirkungsspektrum sind mit dem von Vancomycin vergleichbar (38, 45, 62).

Wie kommt es zu einer verminderten Empfindlichkeit der Enterokokken gegenüber Glykopeptiden? Sie kann durch unterschiedliche genetische Veränderungen bedingt sein, nach denen man die Resistenztypen VanA, VanB, VanC, VanD und VanE unterscheidet. Der Resistenzmechanismus ist bei den verschiedenen Typen ähnlich: Das endständige D-Alanin am D-Alanyl-D-Alanin-Rest des Pentapeptides der Bakterienzellwand wird abgespalten und bei VanA, VanB und VanD durch D-Lactat, bei VanC und VanE durch Serin ersetzt. An diese Substituenten können Glykopeptide nicht mehr oder nur schlecht binden (37, 85, 89).

Am häufigsten ist der Genotyp VanA. Die betreffenden Stämme zeigen eine Resistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin. Induziert werden kann vanA durch Glykopeptide (Vancomycin, Teicoplanin, Avoparcin und Ristocetin) und einige andere Stoffe (u.a. Bacitracin und Polymixin B) (10, 85). Das vanA-Gen ist auf einem Transposon lokalisiert, welches wiederum häufig in ein konjugatives Plasmid integriert ist (10). Dadurch ist eine Übertragung der Resistenzgene sowohl zwischen verschiedenen Enterokokkenstämmen als auch auf andere grampositive Bakterienspezies, wie z.B. Staphylokokken, möglich. Insgesamt finden sich auf dem Transposon die Gene für neun Proteine. Die Proteine ORF1 und ORF2 sind zuständig für die Transposition. Die Gene vanR und vanS kodieren für Regulatorproteine, die erst bei An-

wesenheit von Glykopeptiden die Expressierung der eigentlichen Resistenzgene *vanH*, *vanA* und *vanX* induzieren (5, 89). *VanH* ist eine Dehydrogenase, die Pyruvat in D-Lactat umwandelt. Die von *vanX* kodierte Peptidase spaltet das endständige D-Alanin des entsprechenden Zellwandbausteines ab. Mit Hilfe der Ligase *VanA* wird nun das D-Lactat an die Stelle des D-Alanins gesetzt (85, 89). Die akzessorischen Proteine *VanY* und *VanZ* werden mit Resistenz bei Alaninüberschuss bzw. mit spezifischer „low-level“-Teicoplaninresistenz in Verbindung gebracht (89).

Enterokokken des *VanB*-Typs zeigen nur eine Resistenz gegen Vancomycin. Gegenüber Teicoplanin bleiben sie zumeist empfindlich (10, 85). Das *vanB*-Gen kodiert ebenfalls für eine Ligase und kann sowohl auf dem Chromosom als auch auf Plasmiden lokalisiert sein. Somit handelt es sich auch hier um eine übertragbare Resistenz (11, 65, 89).

Der *VanC*-Typ findet sich als natürliche Resistenzeigenschaft gegen Vancomycin bei den Spezies *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* und *E. flavescens*. Das Resistenzniveau ist jedoch so gering, dass es therapeutisch ohne Bedeutung ist (10, 37, 85).

Der *VanD*-Typ zeigt eine Resistenz gegen Vancomycin und Teicoplanin, *VanE* nur gegen Vancomycin. Diese beiden Typen sind bisher sehr selten aufgetreten und sind für die Praxis bislang ohne Bedeutung (37, 85).

Als hauptsächliche Ursachen für die Verbreitung der Vancomycinresistenz bei Enterokokken werden zwei Möglichkeiten diskutiert: Erstens der gehäufte Einsatz von Glykopeptiden zur Therapie in der Humanmedizin und zweitens die Verwendung von kreuzreagierenden Substanzen in der Tiermast (37, 53).

Für die erste These spricht, dass die Ausbreitung von VRE in Krankenhäusern parallel zu einem deutlichen Anstieg des Vancomycinverbrauchs erfolgte: In den USA stieg der Umsatz von Vancomycin von 1987 bis 1995 von etwa 5000 auf 12800 Kilogramm pro Jahr. Der Pro-Kopf-Verbrauch lag dort 1993 zehn mal so hoch wie in Dänemark (10). Auch am Gießener Universitätsklinikum ist der Vancomycinverbrauch von 1988 bis 1997 um ein Vielfaches gestiegen (siehe Abb. 1.1).

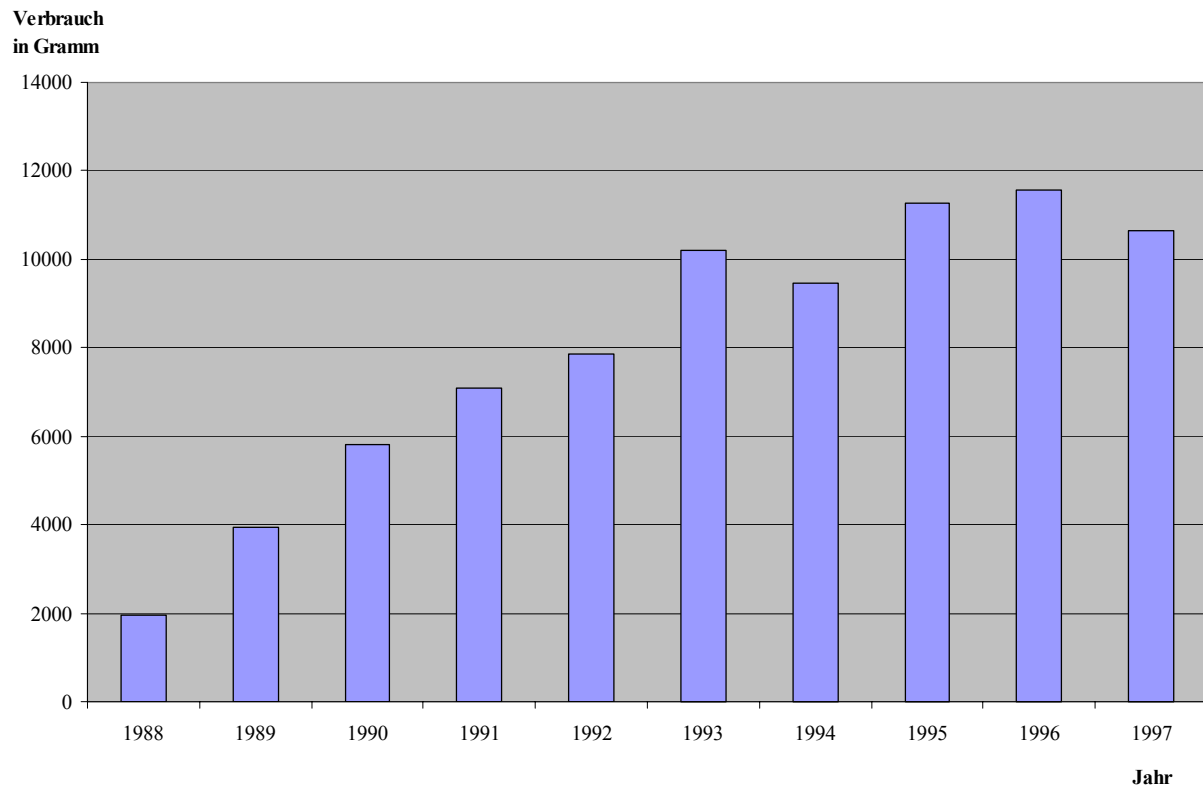


Abb. 1.1: Vancomycinverbrauch des Gießener Universitätsklinikums¹

Zur zweiten Ursache ist anzumerken, dass das Glykopeptid Avoparcin jahrelang als Futterzusatz in der Tiermast (Schweine, Geflügel, Kälber, Rinder) Verwendung fand. Im Jahre 1994 wurden beispielsweise in Dänemark 24000 kg Avoparcin verfüttert, während in der Humanmedizin nur 24 kg Vancomycin verbraucht wurden (86). Im Darm der Tiere wurden dadurch Avoparcin-resistente Enterokokken selektioniert, die auch gegen Vancomycin resistent sind (35, 87). Diese VRE können über die Nahrungskette oder durch mangelhafte Hygiene auf den Menschen übertragen werden; Resistenzgene aus den tierischen VRE können in Enterokokken des Menschen integriert werden (71). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass VRE mit denselben Resistenzgenen auch bei nicht hospitalisierten Personen ohne Kontakt zu Glykopeptiden nachgewiesen werden konnten (34). Dieses Problem führte dazu, dass der Einsatz von Avoparcin in Deutschland im Januar 1996 und in der EU im April 1997 verboten wurde (85, 87). Nach dem Verbot ging die Anzahl der VRE-kontaminierten Lebensmittelproben drastisch zurück. Untersuchungen des Robert-Koch-Instituts ergaben 1994 in

¹ Quelle: Dr. M. Brumhard, Leiter der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen

Deutschland eine massive Kontamination aller untersuchten Proben von im Handel angebotenen Geflügel mit glykopeptidresistenten Enterokokken. 1997, ein Jahr nach dem Verbot des Avoparcineinsatzes, waren nur noch 25% der untersuchten Proben in geringen Konzentrationen durch VRE kontaminiert (36).

Eine weitere Gefahr, die mit der Glykopeptidresistenz von Enterokokken einhergeht, ist die Tatsache, dass die plasmid-gebundenen Resistenzgene auf weitaus pathogenere Erreger, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, übertragen werden können. Im Labor ist diese Übertragung bereits gelungen. Es wird befürchtet, dass solche Situationen künftig auch in Krankenhäusern auftreten könnten (57, 60, 68).

Das Auftreten von VRE bei Patienten des Universitätsklinikums Gießen gab Anlass zu den vorliegenden Untersuchungen. Als Risikofaktoren für eine Infektion oder Kolonisation von Krankenhauspatienten mit VRE werden in der Literatur diskutiert (10, 12, 22, 85, 89):

- eine vorausgegangene Therapie mit Vancomycin
- eine vorausgegangene Therapie mit Breitbandantibiotika, insbesondere Cephalosporinen
- die Grunderkrankung der Patienten, insbesondere chronisches Nierenversagen, Malignome und Transplantationen
- die Dauer des Krankenhausaufenthaltes
- die Nähe zu Patienten oder Personal mit einer Kolonisation durch VRE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Prävalenz der intestinalen Keimträger in der Allgemeinbevölkerung und unter den Patienten des Gießener Universitätsklinikums zu bestimmen. Es sollte geprüft werden, wie häufig der Resistenztyp VanA ist und welchen Einfluss Risikofaktoren wie die Therapie mit verschiedenen Antibiotika, die Grunderkrankung der Patienten und die Hospitalisationsdauer auf die intestinale Kolonisation mit VRE haben. Ferner sollte durch Vergleich von Resistenzmustern und mittels molekularbiologischer Methoden geklärt werden, ob es sich bei den klinischen Isolaten um verwandte Stämme handelte, die innerhalb des Krankenhauses verbreitet waren. Die Ergebnisse sollten Aufschluss darüber liefern, mit welchen Maßnahmen das Auftreten und die Verbreitung von VRE verhindert werden können.

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchte Personen

Die Untersuchungen umfassten verschiedene Personengruppen:

2.1.1 Nicht hospitalisierte Personen

Vom 12.09.1996 bis zum 27.03.1998 wurden Stuhlproben von 1252 nicht hospitalisierten, gesunden Personen aus dem mittelhessischen Raum untersucht (760 Frauen, 492 Männer; Alter 3 – 68 Jahre, im Mittel 32 Jahre). Es handelte sich dabei um Proben, die zu gesetzlich vorgeschriebenen Kontrolluntersuchungen an das Medizinaluntersuchungsamt am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen eingeschickt wurden (von Gesundheitsämtern, Küchen, Betriebsärztlichen Untersuchungsstellen, usw.).

2.1.2 Patienten des Universitätsklinikums Gießen

Vom 04.11.1996 bis zum 30.04.1998 wurden Stuhlproben von 370 Patienten aus verschiedenen Bereichen des Klinikums untersucht (180 Frauen, 190 Männer; Alter <1 – 86 Jahre, im Mittel 35 Jahre). Die Verteilung der Patienten über die Klinikumsbereiche ist in Tabelle 2.1. dargestellt.

34% dieser Patienten hatten innerhalb der letzten vier Wochen vor Abgabe der Stuhlprobe zumindest ein Mal Vancomycin erhalten (30% nur intravenös, 3% nur oral, 1% intravenös und oral). Patienten mit bereits bekannter VRE-Infektion wurden aus der Studie ausgeschlossen, bei Mehrfachnachweis von VRE bei einem Patienten wurde jeweils die erste Probe gewertet.

Bei den später als „onkologisch-hämatologische Grunderkrankungen“ bezeichneten Erkrankungen handelte es sich um Leukämien (AML, 32 Pat.; CML, 7 Pat.; CLL, 7 Pat.; ALL, 4 Pat.; Haarzell-Leukämie, 1 Pat.), Lymphome (22 Pat.), Plasmozytome (8 Pat.),

Pat.; Haarzell-Leukämie, 1 Pat.), Lymphome (22 Pat.), Plasmozytome (8 Pat.), Myelodysplastische/ Myeloproliferative Syndrome (4 Pat.), Kolonkarzinome (3 Pat.), Metastasen bei unbekanntem Primarius (3 Pat.), Hodentumoren (3 Pat.), Sarkome (3 Pat.), Bronchialkarzinome (2 Pat.), Mundbodenkarzinome (2 Pat.), maligne Histiozytosen (2 Pat.), Mammakarzinom (1 Pat.) und Neuroendokrines Karzinom (1 Pat.); bei den „nephrologischen Grunderkrankungen“ um terminale Niereninsuffizienz und Dialyseabhängigkeit (10 Pat.), Zustand nach Nierentransplantation (20 Pat.), chronische Niereninsuffizienz (3 Pat.), Glomerulonephritis (2 Pat.), Hydronephrose (1 Pat.) und akutes Nierenversagen (1 Pat.).

Tab. 2.1: Patientendaten (Alter: Mittelwert)

Klinikumsbereich	Anzahl	männlich	weiblich	Alter
Innere Medizin gesamt	213	107	106	55,5
• Onkologie/Hämatologie	86	43	43	60,0
• Nephrologie	39	15	24	53,4
• Intensivstation	7	2	5	43,3
• sonstige Stationen	81	47	34	52,7
Kinderklinik gesamt	143	77	66	2,5
• Onkologie/Hämatologie	16	10	6	5,3
• Intensiv- und Frühgeb.-stationen	43	19	24	0,4
• sonstige Stationen	84	48	36	3,0
Neurologie	4	3	1	56,8
Chirurgie	3	1	2	60,7
sonstige Bereiche	7	2	5	30,4

2.2 Untersuchungsmaterial

Von den 1252 nicht hospitalisierten, gesunden Personen und den 370 Patienten aus dem Klinikum wurden Stuhlproben auf VRE untersucht. In den Vergleich der Enterokokkenisolate wurden zusätzlich VRE-Stämme einbezogen, die im gleichen Untersuchungszeitraum von der

Diagnostikabteilung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Gießen aus klinischem Untersuchungsmaterial (Urin, Blutkulturen, Wundabstrichen, Sputum, Katheterspitzen, Stuhl, Rachenabstrichen) isoliert wurden.

2.3 Statistische Methoden

Die Daten werden zunächst durch absolute und relative Häufigkeiten beschrieben. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Einflussfaktoren und der intestinalen Kolonisation mit VRE werden mit Hilfe von Kreuztabellen dargestellt und mittels Chi-Quadrat-Test beurteilt. Der Einfluss der Faktoren als Gesamtheit wird mit Hilfe der logistischen Regression bewertet (43, 66). Die statistische Auswertung der Daten wird mit dem Programm SPSS für Windows Version 6.1.3 durchgeführt.

2.4 Isolierung und Identifizierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken

2.4.1 Material für die Isolierung und Identifizierung

- a) Enterococcosel-Agar mit 50 mg Vancomycin/ Liter (Agar von Becton Dickinson, Heidelberg; Vancomycin von Lilly Deutschland, Gießen)

Enterococcosel-Agar ist ein Eskulin-Galle-Azid-Agar, auf dem selektiv nahezu ausschließlich Enterokokken wachsen können. Die in ihm enthaltene Ochsengalle hemmt andere grampositive Bakterien, während das Natriumazid gramnegative Mikroorganismen unterdrückt. Des Weiteren hydrolysieren Enterokokken das Glykosid Eskulin zu Eskuletin und Glucose. Das Eskuletin verbindet sich mit dem im Medium enthaltenen Eisensalz zu einem dunkelbraunen bis schwarzen Komplex. Diese Farbreaktion ist spezifisch für Enterokokken. Das zugesetzte Vancomycin hemmt das Wachstum aller nicht Vancomycin-resistenten Keime. Die effektive Vancomycin-Konzentration liegt bei 10-20 mg/l, da ein Teil des Vancomycins an Bestandtei-

le des Agars bindet (34). Vancomycin-resistente Enterokokken wachsen als kleine Kolonien, durchscheinend, mit braun-schwarzem bis schwarzem Hof (9, 39, 84).

- b) Enterococcosel™-Bouillon ohne Zusatz von Vancomycin (Becton Dickinson, Heidelberg)

Enterococcosel-Bouillon ist ein Selektivmedium zur Anreicherung von Enterokokken aus Stuhl. Sie hat die gleiche Zusammensetzung wie der oben aufgeführte Enterococcosel-Agar, es fehlen lediglich der Agar und das Vancomycin (9). Während das Wachstum anderer Stuhlkeime durch die Zusätze gehemmt wird, wird das Wachstum von Enterokokken begünstigt. Durch die Anreicherung in der Bouillon als Vorkultur wird die Sensitivität des anschließenden Nachweises von Enterokokken auf Agarplatten erhöht (27, 39).

- c) Columbia-CNA-Agar mit 5% Schafblut und 5 mg Vancomycin/ Liter (Agar von Becton Dickinson, Heidelberg; Vancomycin von Lilly Deutschland, Gießen)

Columbia-CNA-Agar mit 5% Schafblut ist ein Selektivagar für grampositive Mikroorganismen, der eine Beurteilung des Hämolyseverhaltens zulässt. Er enthält Colistin und Nalidixinsäure, die beide das Wachstum gramnegativer Keime hemmen. Durch den Zusatz von Vancomycin können nur Vancomycin-resistente Mikroorganismen darauf wachsen. Als charakteristisch für Enterokokken gelten kleine, blau-gräuliche Kolonien mit γ - oder α -Hämolyse (9, 39, 84).

- d) Wasserstoffperoxid

Das von einigen Bakterien produzierte Enzym Katalase spaltet H_2O_2 in H_2O und O_2 . Wird ein Tropfen Wasserstoffperoxid auf Katalase-positive Kolonien gegeben, kommt es durch das Freisetzen von O_2 zu einem Aufschäumen. Enterokokken sind Katalase-negativ (52), d.h. es findet keine Reaktion statt.

e) RapID STR Identifizierungssystem (LD Labor Diagnostica, Heiden)

Das RapID STR Identifizierungssystem dient der biochemischen Identifizierung grampositiver Kokken. Es ist ein sogenanntes miniaturisiertes System, das nach dem Prinzip der „Bunten Reihe“ funktioniert: Physiologische biochemische Leistungen der Bakterien, wie z.B. die Spaltung von Kohlenhydraten unter Säurebildung, die Hydrolaseaktivität und der Aminosäurenabbau, werden mit Hilfe von Reagenzien und Indikatoren durch Farbreaktionen sichtbar gemacht (62). Jede Spezies besitzt typische Enzymmuster, die sie in die Lage versetzen, bestimmte Stoffe zu metabolisieren. Dies wird genutzt, um Bakterien zu klassifizieren und zu identifizieren. Das RapID STR Identifizierungssystem prüft die Fähigkeit zur Verstoffwechslung folgender Stoffe: L-Arginin, Esculin, Mannitol, Sorbitol, Raffinose, Inulin, p-Nitrophenyl- α ,D-galactosid, p-Nitrophenyl- α ,D-glucosid, p-Nitrophenyl-n-acetyl- β ,D-glucosaminid, p-Nitrophenyl-Phosphat, Tyrosin β -naphtylamid, Hydroxyprolin β -naphtylamid, Lysin β -naphtylamid, Pyrrolidin β -naphtylamid. Die Ergebnisse der Testung ergeben Zahlencodes („Biocodes“), anhand derer die geprüften Bakterien einer bestimmten Spezies zugeordnet werden (4, 52, 90).

f) api 20 Strep Identifizierungssystem (bioMérieux, Nürtingen)

Dieses System dient der biochemischen Identifizierung von Streptokokken und Enterokokken. Es funktioniert nach demselben Prinzip wie der RapID STR Test (s.o.). Es beinhaltet die Auswertung der Verstoffwechslung folgender Stoffe: Pyruvat, Hippurat, Esculin, Pyrrolidonyl-2-naphtylamid, 6-Bromo-2-naphtyl- α -D-Galaktose, Naphtol AS-BI- β -D-glucose, 2-Naphtylphosphat, L-Leucin-2n-amid, Arginin, Ribose, L-Arabinose, Mannit, Sorbit, Lactose, Trehalose, Inulin, Raffinose, Stärke und Glykogen (52).

g) Microbank Kryoröhrchen (Mast Diagnostica, Reinfeld)

Da sich die Untersuchungen über einen längeren Zeitraum erstreckten, mussten die Bakterien langfristig lebensfähig gelagert werden. Diese Möglichkeit bieten die Microbank Kryoröhr-

chen. In ihnen befinden sich Kügelchen mit einer porösen Oberfläche, an die Mikroorganismen vollständig binden. In dieser Form können sie bei -20°C gelagert werden.

2.4.2 Methodik der Isolierung und Identifizierung

2.4.2.1 Nachweis von VRE in Stuhlproben

Eine etwa bohngroße Menge Stuhl wird in 5 ml Enterococcosel-Bouillon gegeben, auf dem Vortexer gut vermischt und bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Nach erneutem Durchmischen werden je zwei Tropfen auf einer Enterococcosel-Agar-Platte und auf einer Columbia-CNA-Agar-Platte fraktioniert ausgestrichen. Die Platten werden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wird ein eventuelles Wachstum beurteilt. VRE-verdächtige Kolonien werden weiter identifiziert. Auf dem Enterococcosel-Agar sind dies kleine Kolonien, durchscheinend, mit braun-schwarzem bis schwarzem Hof und auf dem Columbia-CNA-Agar kleine, blaugrüliche Kolonien mit γ - oder α -Hämolyse.

2.4.2.2 Identifizierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken

Katalase-negative Keime, die charakteristisches Wachstum auf beiden Platten aufweisen, werden nativ unter dem Phasenkontrastmikroskop und nach Gram-Färbung unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Charakteristisch für Enterokokken sind grampositive Kokken, die in kurzen Ketten liegen (33). Verdächtige Kolonien werden mittels RapID STR System biochemisch identifiziert. Die Durchführung und Auswertung der Ergebnisse erfolgt nach Angaben des Herstellers. Bei Keimen, die mit diesem System nicht eindeutig identifiziert werden können, wird eine umfassendere Identifizierung mit dem api 20 Strep-Test durchgeführt.

2.5 Resistenztestung

2.5.1 Agardiffusionstest

2.5.1.1 Material für den Agardiffusionstest

- a) Mueller-Hinton-Agar und Antibiotikatestplättchen (Agar von Oxoid, Basingstoke, England; Testplättchen von Becton Dickinson, Heidelberg)

Die Bestimmung des Resistenzprofils im Agardiffusionstest wird standardisiert mit Mueller-Hinton-Agar und mit Testplättchen, die Antibiotika in bestimmten Konzentrationen enthalten, durchgeführt. Getestet wird jeweils die Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Amoxicillin/Clavulansäure, Erythromycin, Clindamycin, Fosfomycin, Vancomycin, Tetracyclin, Gentamicin und Cefazolin (84).

2.5.1.2 Methodik des Agardiffusionstestes

Zur Bestätigung der Vancomycin-Resistenz und zur vorläufigen Prüfung des Resistenzverhaltens wird eine Resistenztestung im Agardiffusionstest nach NCCLS-Norm durchgeführt (55). Zu diesem Zweck wird eine Suspension der Keime in einer Konzentration von etwa 10^6 - 10^8 KbE/ml hergestellt. Einige Tropfen dieser Suspension werden auf Mueller-Hinton-Platten gleichmäßig verteilt. Anschließend werden Testplättchen, die mit verschiedenen Antibiotika beschichtet sind, auf den Agar gelegt. Die Antibiotika diffundieren in den Agar und erreichen mit zunehmendem Abstand zu den Plättchen abnehmende Konzentrationen. Die Platten werden 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei Empfindlichkeit gegenüber einem bestimmten Antibiotikum entsteht ein Hemmhof um das entsprechende Testplättchen, in dem es zu keinem Bakterienwachstum kommt. Anhand des Durchmessers des Hofes können die Keime nun als sensibel, intermediär sensibel oder resistent gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum eingestuft werden. Enterokokken sind typischerweise resistent gegen Cephalosporine, Aminoglykoside und Clindamycin, aber empfindlich gegen Aminopenicilline und unterschiedlich sensibel gegen Tetracycline, Makrolide und Fosfomycin.

2.5.2 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Eine genauere Beurteilung als der Agardiffusionstest liefert die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die MHK der Chemotherapeutika gegen VRE wird mittels Mikrodilution nach NCCLS-Norm oder im Etest bestimmt. Die MHK ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, bei der die Vermehrung der Erreger unter definierten Bedingungen verhindert wird. Nach der Bestimmung dieses Wertes können die Bakterien als sensibel, intermediär sensibel oder resistent gegen bestimmte Antibiotika eingestuft werden.

Ein Erreger wird als sensibel bezeichnet, wenn die für ein entsprechendes Chemotherapeutikum ermittelte MHK so gering ist, dass bei einer Therapie mit der üblichen Dosierung höhere Werte als die MHK in Serum bzw. Gewebe erreicht werden. D.h., dass bei geeigneter Indikation im Allgemeinen ein Therapieerfolg zu erwarten ist.

Als intermediär sensibel wird ein Erreger eingestuft, wenn die für ein entsprechendes Chemotherapeutikum ermittelte MHK im Gewebe nicht sicher erreicht werden kann. Intermediär sensibel eingestufte Erreger können jedoch in Geweben, in denen höhere Antibiotikakonzentrationen zu erwarten sind, wie z.B. Harnwege, durch Höherdosierung eliminiert werden.

Ein Erreger gilt als resistent, wenn die MHK höher liegt, als die höchste in vivo erreichbare nicht-toxische Serum- bzw. Gewebekonzentration.

Die MHK-Grenzwerte für die Beurteilung der Empfindlichkeit von Enterokokken gegenüber den ausgetesteten Antibiotika sind in Tabelle 2.2 auf S. 15 angegeben (44, 76, 78, 79, 89).

2.5.3 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels

Mikrodilution

Die MHK-Werte folgender Antibiotika für die isolierten Enterokokken werden mit Hilfe des Mikrodilutionsverfahrens ermittelt: Vancomycin, Teicoplanin, Ampicillin, Gentamicin, Erythromycin, Rifampicin und Chloramphenicol. Dabei wird das Verfahren standardisiert gemäß den Richtlinien des NCCLS durchgeführt (44, 56). Die getesteten Antibiotikakonzentrationen sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Tab. 2.2: Minimale Hemmkonzentration: Grenzwerte der Empfindlichkeit für Entero-
kokken nach NCCLS (Konzentrationen in µg/ml)

Antibiotikum	sensibel bis	resistent
Vancomycin	4	≥ 32
Teicoplanin	8	≥ 32
Ampicillin	2	≥ 16
Gentamicin	4	≥ 16
Erythromycin	0,5	≥ 8
Rifampicin	1	≥ 4
Chloramphenicol	8	≥ 32
Dalfopristin/Quinupristin	1	≥ 4
Fusidinsäure	1	≥ 4

2.5.3.1 Material für das Mikrodilutionsverfahren

a) Mikrotitrationsplatten

b) Mueller-Hinton-Bouillon (Oxoid, Basingstoke, England)

c) Wirkstofflösungen

Vancomycin (2048 mg/l)	(Lilly Deutschland, Gießen)
Teicoplanin (2048 mg/l)	(Hoechst, Bad Soden am Taunus)
Ampicillin (512 mg/l)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Gentamicin (4096 mg/l)	(E. Merck, Darmstadt)
Erythromycin (512 mg/l)	(Sigma Chemical, St. Louis, USA)
Rifampicin (256 mg/l)	(Fatol Arzneimittel, Schiffweiler)
Chloramphenicol (2048 mg/l)	(Sigma Chemical, St. Louis, USA)

2.5.3.2 Methodik des Mikrodilutionsverfahrens

Der Test wird in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zunächst werden alle Vertiefungen mit 50 µl Mueller-Hinton-Bouillon beschickt und in die erste Vertiefung jeweils 50 µl der Wirkstofflösung gegeben. Anschließend wird durch überpipettieren von jeweils 50 µl eine geometrische Verdünnungsreihe angelegt. Dabei werden drei Vertiefungen ausgenommen, die nur Mueller-Hinton-Bouillon enthalten und als Wachstumskontrolle dienen.

Daraufhin werden alle Vertiefungen mit je 50 µl einer Suspension des zu untersuchenden Stammes in einer Konzentration von etwa 10^6 KbE/ml beimpft. Diese Konzentration wird erreicht, indem die Suspension auf McFarland-Standard 0,5 eingestellt (ca. 10^8 Keime pro ml) und anschließend 1:100 verdünnt wird. Es ergibt sich dadurch die in Tabelle 2.3 dargestellte Konzentrationsverteilung.

Tab. 2.3: Verteilung der Antibiotikakonzentrationen in µg/ml in den Mikrotiterplatten für das Mikrodilutionsverfahren; W = Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum.

Antibiotikum	Konzentration											
Vancomycin	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Teicoplanin	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Ampicillin	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	W
Gentamicin	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Erythromycin	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06
Rifampicin	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	W
Chloramphenicol	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	W

Die Platten werden bei 37°C für 18 bis 20 Stunden inkubiert und dann abgelesen. Die MHK ist die niedrigste Konzentration, bei der kein makroskopisch sichtbares Wachstum nachweisbar ist. Die Grenzwerte für die Empfindlichkeit von Enterokokken gegenüber den ausgetesteten Antibiotika sind in Tabelle 2.2 angegeben. Als Kontrollen werden die Stämme ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis*), ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus*) und ATCC 25922 (*Escherichia coli*) mitgeführt.

2.5.4 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Etest

Die MHK von Dalfopristin/Quinupristin und Fusidinsäure werden mittels Etest bestimmt.

2.5.4.1 Material für den Etest

- a) Tryptic Soy Broth (TSB) (E. Merck, Darmstadt)
=CASO-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon f.d. Mikrobiologie)
- b) Mueller-Hinton-Agar (Oxoid, Basingstoke, England)
- c) Etest-Streifen mit Fusidinsäure (AB Biodisk, Solna, Schweden)
- d) Etest-Streifen mit Dalfopristin/Quinupristin (AB Biodisk, Solna, Schweden)

2.5.4.2 Methodik (Etest)

Zur Bestimmung der MHK mittels Etest wird eine Suspension des betreffenden Stammes in TSB hergestellt (entsprechend McFarland-Standard 0,5, ca. 10^8 KbE/ml). Dann werden wenige Tropfen dieser Suspension gleichmäßig auf einer Mueller-Hinton-Agar-Platte verteilt und die Etest-Streifen auf den Agar gelegt. Auf den Etest-Streifen befindet sich in einem definierten exponentiellen Gradienten das jeweilige Antibiotikum, dessen Konzentration auf der Vorderseite anhand einer Skala ablesbar ist. Das Antibiotikum diffundiert in den Agar und erreicht eine mit zunehmendem Abstand zum Streifen abnehmende Konzentration. Die Platten werden bei 37°C über 18 bis 20 Stunden inkubiert und dann abgelesen. Je nach Empfindlichkeit des Erregers entsteht um den Etest-Streifen ein unterschiedlich großer, elliptischer Hemmhof. Die MHK wird von der Skala dort abgelesen, wo sich der Rand der Ellipse mit dem Streifen schneidet (8, 70).

Die Grenzwerte für die Empfindlichkeit gegenüber den ausgetesteten Antibiotika enthält Tabelle 2.2. Als Kontrollen werden die Stämme ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis*) und ATCC 29213 (*Staphylococcus aureus*) mitgeführt.

2.6 Nachweis des Resistenzgens vanA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der selektiven Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte, deren Basenabfolge bekannt ist. Durch eine exponentielle Vervielfältigung können dabei sehr geringe Mengen DNA nachgewiesen werden. Bei der anschließenden Gelelektrophorese werden die Vervielfältigungsprodukte nach ihrer Größe aufgetrennt und durch geeignete Färbemethoden sichtbar gemacht (6, 15, 35, 72).

2.6.1 Material für die Polymerase-Kettenreaktion

2.6.1.1 Zur DNA-Isolierung

- a) Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (24:1)
Chloroform zur Analyse (E. Merck, Darmstadt)
Isoamylalkohol zur Analyse (E. Merck)
- b) CTAB-Lösung (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)
4,1 g NaCl gelöst in 80 ml Aqua bidest
10 g CTAB (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
ad 100 ml Aqua bidest
- c) Ethanol absolut zur Analyse (E. Merck)
- d) Isopropanol
2-Propanol zur Analyse (E. Merck)
- e) NaCl-Lösung 5 M
Natriumchlorid zur Analyse (E. Merck)
- f) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) (Fa. Roth, Karlsruhe)

- g) Proteinase K-Lösung 14 mg/ml (Fa. Boehringer, Mannheim)
- h) SDS 10% (Sodiumdodecylsulfat) (Fa. Boehringer)
- i) TE-Puffer (pH 7,6)
121,14 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan für die Mikrobiologie (E. Merck)
37,224 g Na-EDTA (Tritriplex III) (E. Merck)
ad 1 l Aqua bidest
Salzsäure 37% (E. Merck) zur pH-Wert-Einstellung

2.6.1.2 Zur Amplifikation und Elektrophorese

- a) PCR-Tubes
Ultradünne PCR Soft Tubes 0,5ml (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
- b) Polymerase-Puffer
10 x PCR Buffer 8811 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- c) 10 mM dNTP (Nukleosidtriphosphat) (Boehringer Mannheim, Mannheim)
10 µl 2,5 mM dATP (Li-Salt)
10 µl 2,5 mM dCTP (Li-Salt)
10 µl 2,5 mM dGTP (Li-Salt)
10 µl 2,5 mM dTTP (Li-Salt)
360 µl Aqua bidest (sterilfiltriert)
- d) Primer (TIB MOLBIOL, Berlin)
Primer I: vanA1
Primer II: vanA2
- e) Polymerase
Ampli Taq DNA (Perkin Elmer, Weiterstadt)

- f) DNA-Thermo Cyclor
Personal cyclor (Biometra, Göttingen)
- g) Marker
DNA molecular weight marker VI, 0,25 µg/µl (Boehringer Mannheim)
- h) Bromphenolblau-Lösung
1,5 g Ficoll (Fluka Biochemica)
gelöst in 10 ml Aqua bidest (sterilfiltriert)
und
50 mg Bromphenolblau (E. Merck, Frankfurt a.M.)
gelöst in 1 ml Aqua bidest (sterilfiltriert)
- i) Agarose
Infinity Agarose Standard (Appligene Oncor, Heidelberg)
- j) TBE-Puffer pH 8,0

10 x TBE-Puffer
- 60,60 g 0,5 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Becton Dickinson, Heidelberg)
 - 30,90 g 0,5 M Borat (E. Merck, Ffm)
 - 2,92 g 10mM EDTA (Tritriplex II) (E. Merck, Ffm)
 - ad 1 l Aqua bidest
- 1 x TBE-Puffer
- 200 ml 10 x TBE-Puffer
 - ad 2 l Aqua bidest
- k) Elektrophoresekammer
Horizontal-Elektrophoresekammer Blue Marine (Boehringer Ingelheim, Heidelberg)
- l) Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromidstammlösung

- 0,1 g Ethidiumbromid (E. Merck, Ffm)
- 10 ml Aqua bidest (sterilfiltriert)

Ethidiumbromidlösung

- 50 µl Ethidiumbromidstammlösung
- 1,5 l Aqua bidest (sterilfiltriert)

m) Transilluminator (Hoefer, San Francisco, USA)

2.6.2 Methodik der Polymerase-Kettenreaktion

2.6.2.1 DNA-Aufbereitung

Die Aufbereitung der DNA erfolgt gemäß dem Verfahren nach Ausubel (6). Mit einer sterilen Platinöse werden 3-4 VRE-Kolonien vom Columbia-CNA-Agar abgenommen, in 5 ml TSB gegeben und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Bouillon werden nach gründlicher Durchmischung in ein Eppendorfgefäß gegeben und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das verbliebene Pellet wird in 567 µl TE-Puffer resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, werden 30 µl 10%ige SDS-Lösung und 3 µl Proteinase-K-Lösung (14 mg/ml) zugegeben. Dieser Ansatz wird eine Stunde im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Um die Lyse der Bakterienzellen zu vervollständigen, wird der Ansatz nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl und 80 µl CTAB-Lösung sowie nach gründlicher Durchmischung für weitere 10 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert.

Zur Nukleinsäureextraktion werden 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (24:1) zugegeben, gut durchmischt und für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 700 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) für weitere 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wird die obere wässrige Phase in ein Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 300 µl Isopropanol bei -20°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 300 µl 70%iger Ethanol-lösung (-20°C) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert.

Verbliebene Flüssigkeitsreste werden mit Papiertüchern vorsichtig entfernt und das Pellet eine Stunde bei 37°C getrocknet.

Anschließend wird das Pellet in 50 µl Aqua bidest resuspendiert und 20 Minuten im Wasserbad gekocht. 2,0 µl dieser DNA-Lösung werden schließlich in den Amplifikationsansatz gegeben.

2.6.2.2 Amplifikationsansatz

18,5 µl Aqua bidest

2,5 µl Taq-Polymerase-Puffer (10x)

0,5 µl 10mM dNTP

0,5 µl Primer I (50 pmol)

0,5 µl Primer II (50 pmol)

0,5 µl Taq-Polymerase (2,0 U)

2,0 µl DNA

2.6.2.3 Cyclor-Programm

Das Programm des Thermo Cyclers besteht aus jeweils drei Schritten, die 30 mal wiederholt werden: Denaturierung (Aufspaltung der DNA in Einzelstränge bei 94°C), Annealing (Anbinden der Primer an die Einzelstränge bei 55°C) und Extension (DNA-Synthese mittels DNA-Polymerase ausgehend von den 3'-Enden der Primer bei 72°C). Die Dauer der einzelnen Schritte ist in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Cyclor-Programm für die PCR

Vorgang, Temperatur	Zyklen 1-3	Zyklen 4-30
Denaturierung, 94°C	120 s	60 s
Annealing, 55°C	60 s	30 s
Extension, 72°C	60 s	30 s

Zum Abschluss des Programms bleibt der Cycler 240 Sekunden bei 72°C und kühlt dann bis zum Herausnehmen der Proben auf 4°C ab.

2.6.2.4 Gelelektrophorese und Auswertung

Zur Gelherstellung werden 1,4 g Infinity Agarose Standard in 100 ml TBE-Puffer gelöst, bei 300°C gekocht, auf 56°C abgekühlt und in die Gelkammer gegossen, die nach Erstarren des Gels mit 1 x TBE-Puffer aufgefüllt wird. Anschließend werden 10 µl der vorbereiteten Proben und der DNA molecular weight marker auf das Gel aufgetragen. Zur farblichen Markierung werden zu den Proben jeweils 2 µl Bromphenolblau-Lösung gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgt für drei Stunden bei 100 Volt.

Das Gel wird dann 20 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt, 10 min in Aqua dest gewaschen und abschließend unter UV-Licht beurteilt und fotografiert.

Es werden jeweils eine Positivkontrolle mit vanA und eine Negativkontrolle mitgeführt. Enthält die Untersuchungsprobe vanA, weist sie die gleiche Bande (bei etwa 377 bp) auf wie die Positivprobe. Positive und negative Ergebnisse müssen in einem zweiten Lauf verifiziert werden.

2.7 Genotypisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Die sichersten Methoden zur Prüfung der Identität oder Verwandtschaft von Bakterienisolaten sind molekularbiologische Untersuchungen. Eine etablierte Methode zur Genotypisierung ist die Spaltung des bakteriellen Genoms mit spezifischen Endonukleasen und anschließender Auftrennung der Fragmente in der Pulsfeldgelelektrophorese (pulsed field gel electrophoresis, PFGE).

Dabei wird die genomische DNA der Enterokokken mit einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease in ca. 15-20 Fragmente zerlegt. Für Enterokokken existiert zum Untersuchungszeitpunkt nur eine anerkannte Endonuklease – SmaI. Sie wird von *Serratia marcescens* produziert und hat ihre Schnittstelle an der Basensequenz CCC—GGG (zwischen Cytosin und Guanin). Damit die bakterielle DNA bei ihrer Freilegung nicht spontan zerbricht, werden die noch intakten Zellen vor der Präparation in flüssige Agarose eingegossen. Durch das Erstarren der Agarose in einer Gießform entstehen kleine Blöckchen, die nun weiter verarbeitet werden. Die Zellwände werden mit Hilfe von Lysozym aufgelöst. Die dabei freigesetzten Proteine werden mit Hilfe von Proteinase K gespalten. Durch mehrere Spülvorgänge werden die Spaltprodukte entfernt, die Proteinase wird mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) vollständig inaktiviert. Es folgen die Spaltung mit dem Restriktionsenzym SmaI und die Auftrennung in der Pulsfeldgelelektrophorese.

Da die DNA-Spaltprodukte zu groß sind, um im statischen Feld der herkömmlichen Elektrophorese aufgetrennt zu werden, bedient man sich des Pulsfeldes. Schließt man an ein Gel ein elektrisches Feld an, so müssen sich die DNA-Knäuel zuerst orientieren, bevor sie die Wanderung beginnen. Wird nun das erste Feld ab- und ein zweites angeschaltet, das in einem definierten Winkel zum ersten steht, müssen die Moleküle sich neu orientieren. Die Dauer der Umorientierung hängt dabei vom Molekulargewicht der jeweiligen Fragmente ab: Je größer ein DNA-Molekül ist, desto länger dauert es, bis es die Wanderung im elektrischen Feld beginnen kann. Das Zeitintervall von einem Richtungswechsel des Stromfeldes zum nächsten nennt man Pulszeit. Mit geeigneten Pulszeiten lassen sich die Fragmente so voneinander trennen, dass sie am Ende ein stammspezifisches Bandenmuster ergeben – den „genomischen Fingerabdruck“. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Proben werden als Marker Fragmente des Phagen Lambda verwendet. Der

Vergleich von Fragmentlängenmustern verschiedener Isolate ermöglicht dann die Identifizierung verwandter Stämme einer Spezies. Mit dieser Methode lassen sich beispielsweise Infektionsketten im Krankenhaus aufklären (34, 47, 54, 67, 77).

2.7.1 Material für die Genotypisierung

a) PC-Agar

Plate Count Agar (E. Merck, Frankfurt)

b) TSB (Tryptic Soy Broth) (E. Merck, Darmstadt)

=CASO-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon f.d. Mikrobiologie)

c) TE-Puffer (pH 7,6)

0,3722 g 1 mM EDTA (Tritriplex III) (E. Merck, Frankfurt)

1,2114 g 10 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, Karlsruhe)

ad 1 l Aqua bidest.

d) Agarose für die Blöckchenherstellung

In Cert-Agarose 1,5%

- 15 mg In Cert-Agarose (Fa. Biozym, Hess. Oldendorf)
- 1 ml TE-Puffer

e) Gießform für Blöckchenherstellung

Disposable Plug Mold (Bio-Rad Labs, Richmond, CA, USA)

f) Lysispuffer

29,3 g 1 M NaCl

363 mg 6 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, Karlsruhe)

18,61 g 100 mM EDTA (Tritriplex III) (E. Merck, Frankfurt a.M.)

2,5 g 0,5% Brij (Polyoxyethylene-10-Cetyl-Ether) (E. Merck)

2,5 g 0,5% Laurylsarkosin (E. Merck)

1,0 g 0,2% Desoxycholat (E. Merck)

ad 500 ml Aqua bidest

g) Lysislösung (Einzelansatz)

1 mg Lysozym 50000 U/mg (Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim)

200 µl Lysispuffer

h) Proteinase K-Lösung

14 mg/ml Proteinase K-Lösung (600 U/ml) (Fa. Boehringer Mannheim)

i) PMSF (100 mM)

174,2 mg PMSF (Fa. Boehringer Mannheim)

10 ml Isopropanol (E. Merck, Frankfurt a.M.)

Lagerung bei -20°C

j) Restriktase-Lösung (Einzelansatz)

20 µl 10 x SmaI Universalpuffer (=10 x Multi Core Buffer 8811) (Fa. Boehringer, Mannheim)

1 µl Enzym SmaI (40 U/µl) (Fa. Boehringer)

179 µl Aqua bidest

k) Agarose für das Laufgel

Molecular Biology Certified Agarose, Ultra Pure DNA grade Agarose (Bio-Rad Labs, Richmond, CA, USA)

l) TBE-Puffer (0,5fach) für das Laufgel

10 x TBE-Puffer

- 60,60 g 0,5 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Becton Dickinson, Heidelberg)
- 30,90 g 0,5 M Borat (E. Merck, Ffm)
- 2,92 g 10 mM EDTA (Tritriplex II) (E. Merck, Ffm)
- ad 1 l Aqua bidest

0,5 x TBE-Puffer

- 100 ml 10 x TBE-Puffer
- ad 2 l Aqua bidest

m) Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromidstammlösung

- 0,1 g Ethidiumbromid (E. Merck, Ffm)
- 10 ml Aqua bidest (sterilfiltriert)

Ethidiumbromidlösung

- 50 µl Ethidiumbromidstammlösung
- 1,5 l Aqua bidest (sterilfiltriert)

n) Transilluminator (Hoefer, San Francisco, USA)

o) Marker

Pulsed-Field Marker (50-1000 kb und 0,1-200 kb) (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

p) PFGE-Gerät

CHEF-DR-TM II System (Bio-Rad Labs, Richmond, CA, USA)

incl. Laufblock

2.7.2 Methodik der Genotypisierung

2.7.2.1 Anzucht der Isolate

Eine Enterokokkenkolonie wird vom PC-Agar abgenommen und in 20 ml TSB für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.7.2.2 Herstellung der Blöckchen für die Pulsfeldgelelektrophorese

Nach Abkühlung auf 4°C wird die Kultur für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wird in 5 ml TE-Puffer bei 4°C gewaschen, erneut 10 Minuten zentrifugiert und in 250 µl TE-Puffer bei 4°C resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wird zu 2,5 ml TE-Puffer pipettiert, bis eine Trübung entsteht, die einer bei 620 nm gemessenen photometrischen Transmission von 0,50 entspricht. Dies ergibt eine Bakterienkonzentration von 5×10^8 VRE / ml.

Die Bakteriensuspension wird auf 56°C aufgewärmt. Für die Herstellung eines Blöckchens werden 100 µl Suspension mit 100 µl In Cert-Agarose (ebenfalls 56°C) im Eppendorfhütchen vermischt und gleich luftblasenfrei in die zum System gehörige Gießform gefüllt. Nach 30 Minuten bei 4°C ist die Agarose erhärtet.

2.7.2.3 Zelllysis

Die Blöckchen werden zu je 200 µl Lysislösung (=Lysispuffer mit Lysozym) gegeben und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Lysozym mit EDTA wird benutzt, um die Zellwände der Bakterien zu zerstören. Die Detergenzien Deoxycholat und Laurylsarkosin weichen die Zellwand auf und ermöglichen ihre Zerstörung durch Lysozym.

2.7.2.4 Deproteinisierung

Zur Spaltung der Proteine werden pro Blöckchen 5 µl der Proteinase K-Lösung direkt auf den Lysisansatz mit den Blöckchen gegeben und dieser 24 Stunden bei 56°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird der flüssige Überstand abgezogen. Dann werden 200 µl TE-Puffer zugegeben und nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wieder entfernt. Dieser Spülvorgang wird ein Mal wiederholt. Anschließend werden die Blöckchen zwei Mal für eine Stunde in 200 µl TE-Puffer und 2 µl PMSF inkubiert und danach zwei Mal mit je 200 µl TE-Puffer für 30 Minuten gespült. Die Blöckchen können dann bei Bedarf in 1 ml TE-Puffer im Kühlschrank gelagert werden.

2.7.2.5 Restriktionsverdau

Die Blöckchen werden zu je 200 µl Restriktase-Lösung gegeben und 24 Stunden im Wasserbad bei 25°C inkubiert. Nach Ablauf der Restriktionszeit werden sie zwei Mal 30 Minuten in je 500 µl TBE (0,5fach) als Stoppuffer gewaschen, bevor sie in das Laufgel eingebracht werden.

2.7.2.6 Herstellung und Bestückung des Laufgels

1,32 g Agarose für das Laufgel werden in 120 ml TBE-Puffer (0,5fach) gelöst, 15 Minuten gekocht und dann auf 56°C abgekühlt. 2 ml des Gels werden abgenommen und bei 56°C aufbewahrt. Der Rest wird bei eingesetztem Kamm zur Bildung von Geldaschen in den Laufblock gegossen. Nach 40 Minuten im Kühlschrank wird der Kamm entfernt, das Gel erkaltet noch weiter. Anschließend werden die Marker und die Blöckchen mit der DNA in die Taschen eingeführt. Die Taschen werden mit dem vorher abgenommenen Gel luftblasenfrei verschlossen.

2.7.2.7 Pulsfeldgelelektrophorese und Beurteilung

Das PFGE-Gerät wird mit Aqua bidest vorgespült. Der Laufpuffer wird eingefüllt und auf 14°C eingestellt. Dann wird der Laufblock in das Gerät eingesetzt. Der Lauf erfolgt bei 200 Volt über 27 Stunden. Die Pulszeit steigt in den ersten 22 Stunden linear von einer Sekunde auf 13 Sekunden und in den folgenden 5 Stunden von 13 auf 30 Sekunden. Nach Beendigung des Laufes wird das Gel 20 Minuten in Ethidiumbromid gefärbt und 10 Minuten in Aqua dest gewaschen. Die aufgetrennten DNA-Banden werden im UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Nur Stämme mit genau gleichem Bandenmuster werden als identisch gewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Kolonisationsraten und Einflussfaktoren

Bei 9 der 1252 untersuchten gesunden, nicht hospitalisierten Personen wurden Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) aus Stuhlproben isoliert (0,7%). Im Gießener Universitätsklinikum wurden bei 29 von 370 stationären Patienten aus Stuhl VRE isoliert (7,8%). Dabei ergaben sich innerhalb des Klinikums erhebliche Unterschiede: Während auf nephrologischen Stationen 26%, auf der onkologisch-hämatologischen Kinderstation 25% und auf der onkologisch-hämatologischen Erwachsenenstation 9% der untersuchten Patienten kolonisiert waren, wurden aus den Stuhlproben der restlichen Stationen in 3% der Fälle VRE isoliert. Eine

Tab. 3.1: VRE-Kolonisationsraten und Häufigkeit der Vancomycintherapie bei hospitalisierten und nicht hospitalisierten Personen

Gruppen	n	VRE-Kolonisation	Vancomycintherapie
nicht hospitalisierte Personen	1252	9 (0,7%)	0 (0%)
weiblich	760	5 (0,7%)	0 (0%)
männlich	492	4 (0,8%)	0 (0%)
Patienten Klinikum	370	29 (7,8%)	125 (34%)
weiblich	180	12 (7%)	66 (37%)
männlich	190	17 (9%)	59 (31%)
Innere Medizin gesamt	213	23 (11%)	90 (42%)
Onkologie/ Hämatologie	86	8 (9%)	42 (49%)
Nephrologie	39	10 (26%)	30 (77%)
sonstige Stationen	88	5 (6%)	18 (20%)
Kinderklinik gesamt	143	6 (4%)	32 (22%)
Onkologie/ Hämatologie	16	4 (25%)	4 (25%)
sonstige Stationen	127	2 (2%)	28 (22%)
Sonstige Bereiche	14	0 (0%)	3 (21%)

detailliertere Übersicht gibt Tabelle 3.1.

Bei hospitalisierten Patienten des Klinikums war die Kolonisationsrate deutlich höher als bei gesunden, nicht hospitalisierten Personen. Mit der Hospitalisationsdauer stieg sie zudem an: Sie betrug in der ersten Woche 5%, in der zweiten bis dritten Woche 10% und stieg danach auf über 11% an.

Der Einfluss der Faktoren Grunderkrankung, vorherige Vancomycintherapie, vorherige Cephalosporintherapie und sonstige Antibiotikatherapie auf die Kolonisationsrate ist in Tabelle 3.2 in Form von Kreuztabellen dargestellt. Kriterium für einen Effekt der möglichen Einflussfaktoren ist jeweils das Ergebnis des Chi-Quadrat-Testes bzw. die daraus resultierende Irrtumswahrscheinlichkeit P. Die Grunderkrankungen sind in Kapitel 2.1.2 aufgeführt.

Tab. 3.2: Verteilung der kolonisierten und nicht kolonisierten Patienten im Klinikum nach möglichen Risikofaktoren; die Prozentzahlen in Klammern stehen für die Kolonisationsrate bzw. die Rate nicht kolonisierter Personen innerhalb der jeweiligen Gruppe; P = Irrtumswahrscheinlichkeit im Chi-Quadrat-Test

Untergruppen	VRE-Kolonisation	keine VRE-Kolon.	n	Chi-quadrat
--------------	------------------	------------------	---	-------------

1.

nephrologische Grunderkr.	8 (22%)	29 (78%)	37	P = 0,0026
onkol.-hämatol. Grunderkr.	9 (9%)	96 (91%)	105	
sonstige Grunderkrankung	12 (5%)	216 (95%)	228	
gesamt	29 (7,8%)	341 (92,2%)	370	

2.

nach Vancomycintherapie	19 (15%)	106 (85%)	125	P = 0,00017
ohne Vancomycintherapie	10 (4%)	235 (96%)	245	
gesamt	29 (7,8%)	341 (92,2%)	370	

3.

nach Cephalosporintherapie	12 (10%)	106 (90%)	118	P = 0,25
ohne Cephalosporintherapie	17 (7%)	235 (93%)	252	
gesamt	29 (7,8%)	341 (92,2%)	370	

4.

nach sonstiger Antibiotikath.	19 (10%)	169 (90%)	188	P = 0,099
ohne Antibiotikatherapie	10 (5%)	172 (95%)	182	
gesamt	29 (7,8%)	341 (92,2%)	370	

Diese univariate Berechnung der Daten berücksichtigt aber noch nicht die Abhängigkeiten der verschiedenen Einflussvariablen untereinander. So ist es notwendig, die verschiedenen Faktoren in einem Gesamtmodell zu bewerten, um die tatsächlich bedeutsamen Variablen herauszufiltern. Der statistische Test der Wahl zur simultanen Berechnung mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable ist die logistische Regression, da sie diese Abhängigkeiten berücksichtigt. Tabelle 3.3 enthält die Ergebnisse dieser Berechnung.

Tab. 3.3: Ergebnisse der logistischen Regression von Vancomycintherapie, Cephalosporintherapie, sonstiger Antibiotikatherapie (außer Glykopeptiden und Cephalosporinen) und Grunderkrankung (nephrologische, onkol.-hämatologische oder sonstige Erkrankung) auf die Kolonisation mit VRE; die Fallzahlen lassen sich Tabelle 3.2 entnehmen, n (gesamt) = 370, Regressionskoeff.: Regressionskoeffizient, Irrtumswahrsch.: Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s.: nicht signifikant

Einflussfaktor	Regressionskoeff.	Irrtumswahrsch. P	relatives Risiko
Vancomycin	0,15	0,012	3,2
Cephalosporine	0,0	0,69 n.s.	1,2
Sonstige Antibiotika	0,0	0,92 n.s.	0,95
Grunderkrankung	0,06	0,09 n.s.	--

Ergebnis

Die logistische Regression von Therapie mit Vancomycin, Cephalosporinen bzw. sonstigen Antibiotika und Grunderkrankung der Patienten auf die intestinale Kolonisation mit VRE liefert die vorherige Vancomycintherapie als einzige relevante Einflussgröße ($P=0,012$). Vancomycintherapie und Kolonisation mit VRE korrelieren positiv miteinander. Der Einfluss von Cephalosporin-, sonstiger Antibiotikatherapie und Grunderkrankung ist bei einer üblichen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 statistisch nicht signifikant.

Das relative Risiko der intestinalen Kolonisation mit VRE beträgt bei vorheriger Vancomycintherapie 3,2 - d.h. die Wahrscheinlichkeit der Kolonisation steigt durch die Vancomycintherapie um diesen Faktor. Das 95%-Konfidenzintervall für dieses relative Risiko liegt bei 1,27 bis 8,3.

Die Kolonisationsrate der Patienten, die mit Vancomycin therapiert worden waren, lag bei iv-Applikation bei 15%, bei ausschließlich oraler Applikation bei 18%. Von den vier Patienten,

die Vancomycin oral und intravenös erhalten hatten, war einer (25%) intestinal mit VRE kolonisiert (wegen der geringen Fallzahlen sind diese Unterschiede statistisch nicht zu verwerten).

3.2 Speziesidentifizierung

Bei 70 VRE-Isolaten aus Stuhlproben und anderem klinischen Untersuchungsmaterial wurde eine biochemische Speziesidentifizierung durchgeführt. Dabei wurden 67 Isolate als *E. faecium*, zwei als *E. faecalis* und eines als *E. durans* identifiziert. Der *E. durans*-Stamm wurde aus Stuhl einer Patientin der Kinderklinik isoliert. Eine genaue Darstellung findet sich in Tab. 3.4.

Tab. 3.4: Zuordnung der Enterokokkenspezies zu ihrer Quelle und dem nachgewiesenen Resistenzgen (der Nachweis von vanA erfolgte nur bei 64 *E. faecium*-Stämmen, 3 wurden nicht untersucht).

Enterokokkenspezies	Untersuchungsmaterial			Resistenzgen	
	Stuhl, nicht hospitalisierte Personen	Stuhl, hospitalisierte Patienten	anderes klinisches Material	vanA-positiv	vanA-negativ
<i>E. faecium</i> (n=67)	8	35	24	54 ¹	10 ¹
<i>E. faecalis</i> (n=2)	1	1	0	0	2
<i>E. durans</i> (n=1)	0	1	0	1	0

3.3 Nachweis des Resistenzgens vanA

Bei 55 von 67 untersuchten VRE-Isolaten¹ ließ sich mittels der Polymerase-Kettenreaktion das vanA-Gen nachweisen (82%). Da keine weiteren Resistenzgene untersucht wurden, blieb der Resistenzmechanismus der übrigen Isolate unbekannt. Abb. 3.1 zeigt die gelelektrophoretische Darstellung des vanA-Gens verschiedener Stämme.

¹ Während der Untersuchungen waren 3 *E. faecium* nicht mehr anzüchtbar, die folglich in der PCR nicht untersucht werden konnten.

In Tab. 3.5 ist die Herkunft der vanA-positiven Isolate angegeben. Der Anteil der vanA-positiven Stämme war in den drei Gruppen (Stuhl hospitalisierter und nicht hospitalisierter Personen, anderes Untersuchungsmaterial) etwa gleich häufig (78-86%).

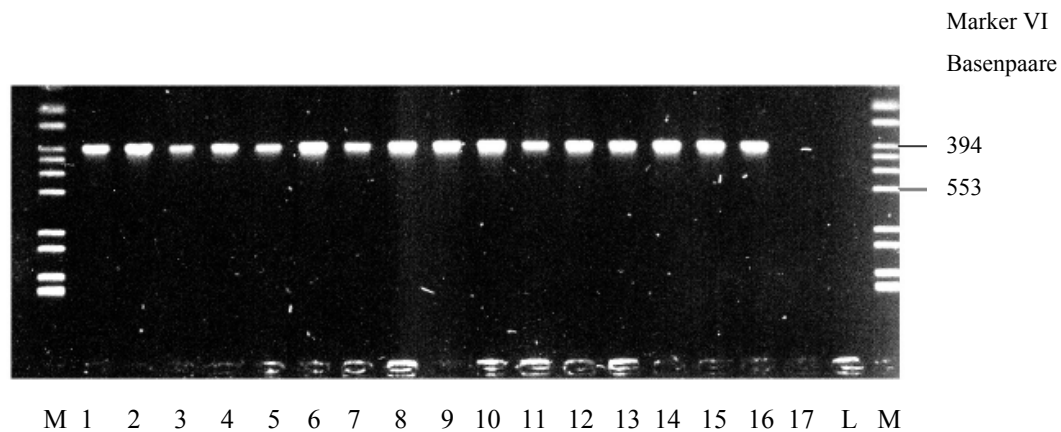


Abb. 3.1: Gelelektrophoretische Darstellung des vanA-Gens nach PCR

Bahnen: 1 – 8:	E. faecium, Stuhlproben; klinische Isolate
9 – 12:	E. faecium, Stuhlproben; gesunde, nicht hosp. Personen
13 – 15:	E. faecium, Urinproben; klinische Isolate
16:	E. faecium, Positivkontrolle (Veterinärmedizin Gießen)
17:	E. faecium, Negativkontrolle (ATCC 6057)
L:	Leerwert
M:	DNA molecular weight marker VI (Boehringer Mannheim)

Tab. 3.5: Anteil der Isolate mit nachgewiesenem vanA-Gen aufgeschlüsselt nach ihrer Quelle

Untersuchungsmaterial	Anzahl der Isolate	vanA-positiv
Stuhl, hospitalisierte Patienten	37	30 (81%)
Stuhl, nicht hospitalisierte Personen	9	7 (78%)
anderes klinisches Material	21	18 (86%)
alle	67	55 (82%)

3.4 Resistenzprofil

3.4.1 Resistenz gegen Glykopeptide

Die Resistenz der VRE gegenüber Glykopeptiden wurde durch die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentrationen geprüft. Alle Isolate waren resistent gegen Vancomycin. Die MHK-Werte lagen im Bereich von 64 bis über 512 µg/ml. Gegenüber Teicoplanin bestanden Unterschiede zwischen vanA-positiven und vanA-negativen Stämmen (siehe Tab. 3.6). Wäh-

Tab. 3.6: Vergleich der In-vitro-Aktivitäten verschiedener Antibiotika gegen vanA-positive und vanA-negative VRE-Isolate (MHK₅₀ und MHK₉₀: MHK für mindestens 50% bzw. 90% der jeweiligen Isolate)

vanA-Gen	Antibiotikum	MHK (µg/ml)		
		MHK-Bereich	MHK ₅₀	MHK ₉₀
positiv (n = 55)	Vancomycin	64 - >512	512	>512
	Teicoplanin	32 - >512	256	512
	Ampicillin	≤0,13 - 128	128	>128
	Gentamicin	4 - >1024	>1024	>1024
	Erythromycin	>128	>128	>128
	Rifampicin	≤0,06 - >64	4	16
	Chloramphenicol	4 - 64	8	32
	Dalfo/Quinupr.	0,5 - >32	0,75	4
	Fusidinsäure(n=47)	1 - 6	2	2
negativ (n = 12)	Vancomycin	64 - >512	512	>512
	Teicoplanin	4 - 256	64	128
	Ampicillin	1 - 64	8	64
	Gentamicin	16 - >1024	32	>1024
	Erythromycin	1 - >128	>128	>128
	Rifampicin	≤0,06 - 16	2	8
	Chloramphenicol	8 - 32	8	32
	Dalfo/Quinupr.	0,5 - 32	1	8
	Fusidinsäure(n=10)	1 - 2	1	2

rend die vanA-positiven Isolate alle resistent waren mit MHK-Werten von 32-512 µg/ml, waren die MHK-Werte der Stämme ohne vanA-Gen, deren Resistenztyp nicht spezifiziert wurde, niedriger (4-256 µg/ml).

Tab. 3.7 zeigt die Verteilung der Resistenz bei den einzelnen Enterokokkenspezies. Die beiden *E. faecalis*-Isolate, die nicht das vanA-Gen besaßen, waren gegen Teicoplanin mäßig sensibel. Das *E. durans*-Isolat, das ebenso wie die meisten *E. faecium* vanA-positiv war, war gegen Vancomycin und Teicoplanin resistent. Die geringe Anzahl dieser Isolate lässt jedoch keine repräsentativen Schlüsse zu.

Tab. 3.7: Empfindlichkeitsverteilung (in %) der Enterokokkenspezies gegen verschiedene Antibiotika (VA: Vancomycin, TPL: Teicoplanin, AM: Ampicillin, GM: Gentamicin, C: Chloramphenicol, Da/Qu: Dal-fopristin/Quinupristin)

Spezies	vanA-Gen-positiv	Empfindlichkeit	VA	TPL	AM	GM	C	Da/Qu
<i>E. faecium</i> (n = 67)	84%	sensibel	0	1	3	1	61	79
		interm. sens.	0	1	16	5	22	9
		resistent	100	98	81	94	17	12
<i>E. faecalis</i> (n = 2)	0%	sensibel	0	0	100	0	50	0
		interm. sens.	0	100	0	0	50	0
		resistent	100	0	0	100	0	100
<i>E. durans</i> (n=1)	100%	sensibel	0	0	100	0	0	100
		interm. sens.	0	0	0	0	0	0
		resistent	100	100	0	100	100	0

3.4.2 Resistenz gegen andere Antibiotika

Die bei Enterokokkeninfektionen üblicherweise eingesetzten Antibiotika waren gegen die meisten Isolate nicht wirksam: 77% der VRE waren resistent gegen Ampicillin, 66% gegen Amoxicillin mit Clavulansäure. Gegen Gentamicin waren 94% der Isolate resistent, wobei sie in etwa der Hälfte der Fälle eine Hochresistenz (über 1024 mg/l) aufwiesen. Resistenz gegen Erythromycin zeigten 99% der Isolate.

Die anderen untersuchten Antibiotika zeigten unterschiedliche Wirksamkeiten. 19% der VRE waren empfindlich gegen Rifampicin, 24% gegen Fusidinsäure. Chloramphenicol zeigte in 60% der Fälle eine ausreichende In-vitro-Aktivität gegen die untersuchten VRE; 23% wurden als intermediär sensibel und 17% als resistent eingestuft. Die größte Wirksamkeit zeigte das Streptogramin Dalfopristin/Quinupristin, obwohl auch bei diesem neuen, zum Studienzeitpunkt noch nicht zugelassenen Antibiotikum Resistenzen auftraten: 77% der Isolate waren sensibel, 9% intermediär sensibel und 14% resistent. In Tab. 3.9 und Abb. 3.2 ist die Empfindlichkeitsverteilung der VRE gegen verschiedene Antibiotika dargestellt.

Kein Isolat war gegen alle ausgetesteten Antibiotika multiresistent, d.h. es existierte prinzipiell für jeden Keim eine Therapiealternative. Einige Stämme waren jedoch nur sensibel gegen Dalfopristin/Quinupristin oder Chloramphenicol, die toxischer sind als die anderen Antibiotika. Die Empfindlichkeitsverteilung dieser Keime ist in Tab. 3.8 dargestellt. Der dort aufgeführte, gegen Dalfopristin/Quinupristin resistente Stamm war intermediär sensibel gegen Chloramphenicol, schwach resistent gegen Gentamicin (32 µg/ml) und sensibel gegen Fusidinsäure. Während des Untersuchungszeitraumes trat er nur als Kolonisationskeim auf, d.h. er führte zu keiner Infektion.

Tab. 3.8: Empfindlichkeit gegen Chloramphenicol und Dalfopristin/Quinupristin derjenigen VRE, die gegen alle anderen getesteten, systemisch verabreichbaren Antibiotika resistent waren (interm. sensibel: intermediär sensibel)

Untersuchungs- material	Empfindlichkeit	Anzahl der Isolate	
		Chloramphenicol	Dalfopristin/ Quinupristin
Stuhl, nur klini- sche Isolate (n = 17)	sensibel	10	16
	interm. sensibel	5	0
	resistent	2	1
anderes klini- sches Material (n = 12)	sensibel	11	12
	interm. sensibel	1	0
	resistent	0	0

In Tab. 3.9 ist die Resistenzverteilung der Stämme nach der Herkunft aus Stuhl oder aus anderem klinischen Untersuchungsmaterial dargestellt. Mit Ausnahme einiger Isolate aus Stuhl, die im Gegensatz zu den anderen Isolaten gegen Chloramphenicol, Dalfopristin/Quinupristin und Fusidinsäure resistenter waren, ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Tab. 3.9: Empfindlichkeit (%) der VRE-Isolate gegen verschiedene Antibiotika

(VA: Vancomycin, TPL: Teicoplanin, AMC: Amoxicillin + Clavulansäure, E: Erythromycin, GM: Gentamicin, AM: Ampicillin, Rifa: Rifampicin, C: Chloramphenicol, Dal/Qu: Dalfopristin/Quinupristin, FA: Fusidinsäure, FF: Fosfomycin)

Alle VRE-Isolate, n=70

Antibiotika	VA	TPL	AMC	E	GM	AM	Rifa	C	Dal/Qu	FA	FF
sensibel	0	1	24	0	1	7	19	60	77	24	2
intermediär	0	4	10	1	4	16	11	23	9	68	56
resistent	100	95	66	99	95	77	70	17	14	8	42

n=59 n= 63

VRE-Isolate aus Stuhlproben (Patienten und nicht hospitalisierte Personen), n=46

Antibiotika	VA	TPL	AMC	E	GM	AM	Rifa	C	Dal/Qu	FA	FF
sensibel	0	2	37	0	2	11	24	48	65	30	2
intermediär	0	7	4	2	4	24	11	30	13	59	60
resistent	100	91	59	98	94	65	65	22	22	11	38

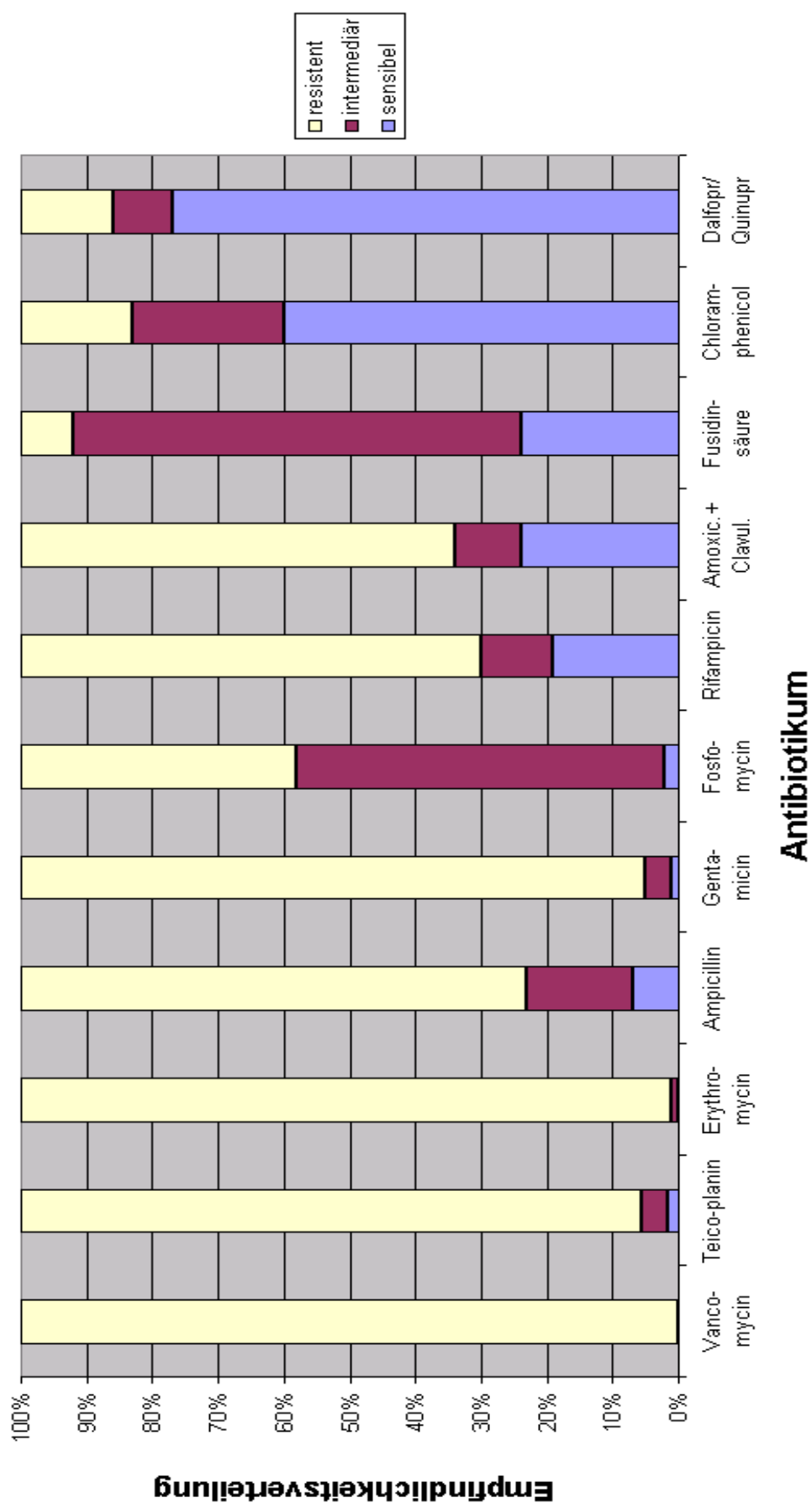
n=44 n= 43

VRE-Isolate aus klinischem Untersuchungsmaterial (außer Stuhl), n=24

Antibiotika	VA	TPL	AMC	E	GM	AM	Rifa	C	Dal/Qu	FA	FF
sensibel	0	0	0	0	0	0	8	84	100	7	0
intermediär	0	0	21	0	4	0	13	8	0	93	50
resistent	100	100	79	100	96	100	79	8	0	0	50

n=15 n= 20

**Abb. 3.2: Empfindlichkeit aller 70 VRE-Isolate aus Stuhl und anderem
klinischem Material gegen verschiedene Antibiotika**



3.5 Untersuchungen zur Verwandtschaft der Isolate

Um die Verwandtschaft der Enterokokken-Isolate zu untersuchen, wurden sie mittels Restriktionsverdau und Pulsfeldgelelektrophorese genotypisiert. Die dabei erzeugten Bandenmuster wurden anschließend miteinander verglichen. Bei 70 VRE-Isolaten von 68 Personen ließen sich 43 voneinander verschiedene Bandenmuster differenzieren. 35 Bandenmuster wurden bei jeweils einem Isolat nachgewiesen; 8 Bandenmuster traten bei mehreren VRE auf.

Die 9 VRE-Isolate aus Stuhlproben gesunder, nicht hospitalisierter Personen wiesen voneinander abweichende Bandenmuster auf, die eine Verwandtschaft unter diesen Stämmen ausschlossen. Die Bandenmuster waren auch mit keinem der klinischen Isolate identisch. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse der Resistenztestung und Biotypisierung: Die Resistenzprofile und Biocodes waren in dieser Gruppe ebenfalls uneinheitlich. Es handelte sich also um klonal unterschiedliche Stämme.

Bei 61 VRE-Isolaten von Patienten des Klinikums (aus Stuhlproben und anderem klinischen Untersuchungsmaterial) ergaben sich zum Teil identische, zum Teil deutlich unterschiedliche Bandenmuster. Die 8 mehrfach nachgewiesenen Bandenmustertypen sind in Tabelle 3.10 aufgeführt. Keime mit identischem Bandenmuster stammten zumeist aus dem gleichen Bereich des Klinikums und wiesen ein einheitliches Resistenzverhalten und einen identischen Biocode auf. Isolate mit identischem Bandenmuster wurden jeweils zu den Bandenmustertypen A-H zusammengefasst (siehe Tab. 3.10). Bei Isolaten aus der Kinderklinik trat hauptsächlich der Bandenmustertyp A auf. Die Bandenmustertypen B, C, D und E wurden ausschließlich bei VRE von Patienten der Nephrologie nachgewiesen, während Typ F bei zwei Patienten der onkologischen Abteilung auftrat. Die Bandenmustertypen G und H wurden hingegen bei Isolaten von Patienten aus voneinander weitgehend unabhängigen Bereichen des Klinikums nachgewiesen. Die entsprechenden Bereiche des Klinikums werden im Folgenden genauer betrachtet.

Die Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen die Bandenmuster einiger Stämme nach Pulsfeldgelelektrophorese. Abb. 3.3 zeigt einige VRE-Isolate mit identischen Bandenmustern aus der Kinderklinik sowie ein abweichendes Bandenmuster aus der Chirurgie, Abb. 3.4 VRE-Isolate aus verschiedenen Bereichen mit zum Teil deutlich unterschiedlichen Bandenmustern. Die Tabellen 3.10 und 3.11 enthalten Informationen zu den entsprechenden Isolaten.

Tab. 3.10: Verteilung der 8 Bandenmustertypen A-H von *Enterococcus faecium* über die Bereiche des Klinikums in unterschiedlichem Probenmaterial; Nachweis des vanA-Gens und Angaben zur vorherigen Therapie mit Vancomycin (Pat: Patient, Onko: Onkologie/Hämatologie, Früh: Frühgeborenenstation, Kardio: Kardiologie, Nephro: Nephrologie, NTX: Nierentransplantationsstation der Medizinischen Klinik, NTX-Amb: Nierentransplantationsambulanz der Medizinischen Klinik, Med Seltersb: Medizinische Klinik am Seltersberg, Neuro: Neurologie, Datum: Probenentnahmedatum (Jahr-Monat-Tag), Biocode: Code im RapID STR-Test, vanA: Nachweis des vanA-Gens, n.u.: nicht untersucht, Vanco: vorherige Vancomycintherapie, iv: intravenös, k.A.: keine Angabe)

Typ	Pat Nr.	Untersuchungs-material	Klinik / Station	Datum	Biocode	vanA	Vanco
A	1	Blut	Kinderklinik / 04	97-10-21	73502	pos	nein
A	1	Stuhl	Kinderklinik / 04	97-10-24	73502	pos	nein
A	2	Stuhl	Kinderklinik / 04	97-10-28	73502	pos	nein
A	3	Katheterurin	Kinderklinik / 04	97-10-26	73502	pos	nein
A	4	Stuhl	Kinderklinik / Onko	98-01-05	73502	pos	intravenös
A	5	Stuhl	Kinderklinik / Onko	98-01-19	73502	pos	oral
A	6	Stuhl	Kinderklinik / Onko	98-02-10	73502	pos	nein
A	7	Stuhl	Kinderklinik / Früh	98-03-31	75502	pos	k. A.
A	8	ZVK-Spitze	Med Klinik / Kardio	97-10-31	73502	pos	intravenös
B	9	Urin	Med Klinik / Nephro	97-10-05	70002	pos	intravenös
B	10	Stuhl	Med Klinik / Nephro	97-12-14	70102	pos	intravenös
C	11	Stuhl	Med Klinik / NTX	97-11-15	70002	pos	intravenös
C	12	Stuhl	Med Klinik / NTX	97-12-08	70002	pos	intravenös
D	13	Stuhl	Med Klinik / NTX	97-11-07	70002	pos	iv und oral
D	14	Leberpunktat	Med / NTX-Amb	97-12-19	70002	pos	iv und oral
E	15	Stuhl	Med Klinik / Nephro	97-12-08	70002	pos	intravenös
E	16	Urin	Med / NTX-Amb	98-01-15	70002	pos	intravenös
E	17	Stuhl	Med Klinik / NTX	98-01-16	70002	pos	intravenös
F	18	Stuhl	Med Seltersb / Onko	97-03-03	70002	neg	intravenös
F	19	Stuhl	Med Seltersb / Onko	97-05-09	70002	neg	intravenös
G	20	Stuhl	Med Seltersb / Onko	97-05-30	70002	pos	intravenös
G	21	Stuhl	Med Seltersb / Onko	97-10-06	70002	pos	intravenös
G	22	Stuhl	Med Seltersb / Onko	98-02-25	70002	pos	nein
G	23	Abstr. SM-Tasche	Med Klinik / Kardio	97-08-22	70002	pos	k. A.
G	24	Urin	Med / NTX-Amb	97-08-22	70002	pos	iv und oral
G	24	Urin	Med Klinik / NTX	98-07-28	70002	pos	intravenös
H	25	Wundabstrich	Chirurgie / Intensiv	98-04-27	70002	pos	intravenös
H	26	Wundabstrich	Chirurgie / 01	98-05-25	70002	n.u.	intravenös
H	27	Bronchialsekret	Chirurgie / Intensiv	98-07-07	70002	pos	intravenös
H	28	Stuhl	Med Seltersb / Onko	98-01-10	70002	pos	intravenös
H	29	Stuhl	Med Klinik / NTX	98-02-07	70002	pos	intravenös
H	30	Vaginalabstrich	Med Klinik / Intensiv	98-04-24	70002	pos	iv und oral
H	31	Katheterurin	Neuro / Intensiv	98-07-11	70002	n.u.	k. A.

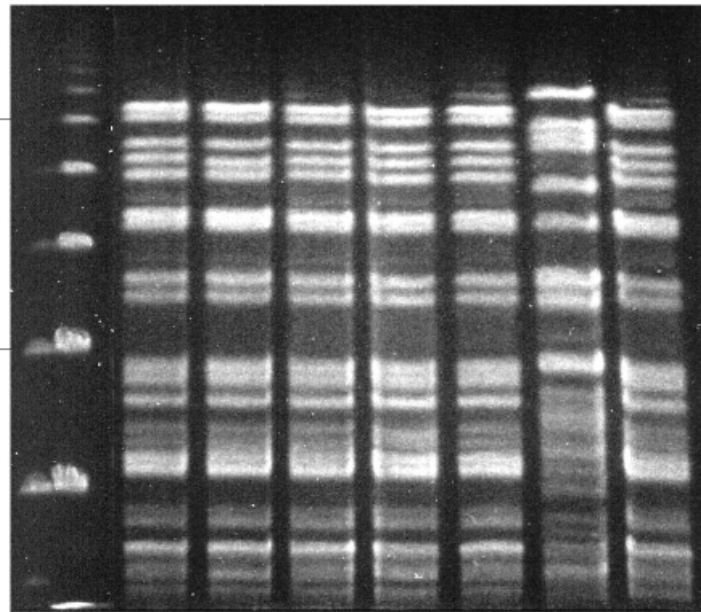
Tab. 3.11: Verteilung der unterschiedlichen Bandenmustertypen über die Bereiche des Klinikums und Bandenmustertypen der Isolate von nicht hospitalisierten Personen; Nachweis des vanA-Gens und Angaben zur vorherigen Therapie mit Vancomycin (Pat: Patient, Onko: Onkologie/Hämatologie, Früh: Frühgeborene, Kardio: Kardiologie, Nephro: Nephrologie, NTX: Nierentransplantationsstation der Medizinischen Klinik, NTX-Amb: Nierentransplantationsambulanz der Medizinischen Klinik, Med Seltersb: Medizinische Klinik am Seltersberg, Med Poli: Medizinische Poliklinik, Datum: Probenentnahmedatum (Jahr-Monat-Tag), Biocode: Code im RapID STR-Test, vanA: Nachweis des vanA-Gens, n.u.: nicht untersucht, Vanco: vorherige Vancomycintherapie, iv: intravenös, k.A.: keine Angabe), Typ L = E. durans, Typen N und ZB = E. faecalis, alle anderen Typen = E. faecium

Typ	Pat Nr.	Untersuchungs-material	Klinik / Station	Datum	Biocode	vanA	Vanco
I	32	Stuhl	Med Seltersb / Onko	97-12-14	70002	pos	intravenös
J	33	Stuhl	Med Klinik / NTX	97-12-30	70002	pos	iv und oral
K	34	Stuhl	Med Seltersb / Onko	96-11-04	70002	pos	intravenös
L	35	Stuhl	Kinderklinik / 04	96-11-19	30002	pos	nein
M	36	Stuhl	Med Poli	96-11-28	70102	neg	nein
N	37	Stuhl	Med Poli	96-11-29	71603	neg	nein
O	38	Stuhl	Med Klinik / 08	96-12-02	70002	neg	nein
P	39	Stuhl	Med Klinik / Nephro	98-01-16	70002	pos	k. A.
Q	40	Stuhl	Kinderklinik / Onko	97-11-02	70002	neg	nein
R	41	Stuhl	Med Klinik / 01	98-03-05	70002	pos	nein
S	42	Stuhl	Med Klinik / 01	98-03-29	70002	pos	nein
T	43	Urin	Med / NTX-Amb	97-11-06	70002	neg	intravenös
U	44	Urin	Med Klinik / 30	97-11-24	70002	pos	k. A.
V	45	ZVK-Spitze	Chirurgie / 02	97-08-18	70002	neg	k. A.
W	46	Stuhl	Kinderklinik / Früh	98-04-16	70502	neg	intravenös
X	47	Stuhl	Kinderklinik / Onko	98-01-08	73502	pos	nein
Y	48	Stuhl	Med Seltersb / 10	96-11-22	70002	pos	nein
Z	49	Katheterurin	Med Klinik / Nephro	98-01-12	70002	pos	k. A.
AA	50	Urin	Med / NTX-Amb	98-03-26	70002	pos	intravenös
AB	51	Urin	Med Klinik / Kardio	98-06-19	70002	n.u.	k. A.
AC	52	Urin	Med Seltersb / Onko	97-08-21	70002	pos	intravenös
AD	53	Wundabstrich	Med Klinik / 08	97-11-17	70002	pos	intravenös
AE	54	Stuhl	Med Klinik / Nephro	98-01-22	70002	pos	intravenös
AF	55	Stuhl	Med Klinik / NTX	98-01-28	70002	pos	intravenös
AG	56	Stuhl	Med Klinik / Nephro	97-11-28	70002	pos	intravenös
AH	57	Stuhl	Med Seltersb / Onko	97-10-20	70002	pos	intravenös
AI	58	Wundabstrich	Med Klinik / Intensiv	97-11-06	70002	neg	intravenös
AJ	59	Sputum	Med Klinik / Intensiv	96-02-15	70102	pos	nein
ZA	60	Stuhl	nicht hospitalisiert	97-06-17	70002	pos	-
ZB	61	Stuhl	nicht hospitalisiert	97-06-17	71602	neg	-
ZC	62	Stuhl	nicht hospitalisiert	96-09-18	70002	pos	-
ZD	63	Stuhl	nicht hospitalisiert	96-09-20	70002	pos	-
ZE	64	Stuhl	nicht hospitalisiert	96-11-19	70402	pos	-
ZF	65	Stuhl	nicht hospitalisiert	97-10-16	70002	pos	-
ZG	66	Stuhl	nicht hospitalisiert	98-01-20	70002	pos	-
ZH	67	Stuhl	nicht hospitalisiert	97-03-17	70002	neg	-
ZI	68	Stuhl	nicht hospitalisiert	97-12-11	70002	pos	-

kb

242,5

97,0



Bahn	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Typ			A	A	A	A	A	V	A

Abb. 3.3: DNA-Fragmentprofil von 7 *E. faecium*-Isolaten nach *Sma*I-Restriktionsverdau und PFGE.

Bahnen 3-7 und 9 zeigen Isolate von Patienten der Kinderklinik mit dem identischem Bandenmustertyp A, Bahn 8 ein Isolat aus der Chirurgischen Klinik mit abweichendem Muster.

Bahn 1: Lambda-Ladder I = Pulsed-Field Marker 0,1-200 kb, Bahn 2: Lambda-Ladder II = Pulsed-Field Marker 50-1000 kb (beide Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Bahn 3: Blutkulturiolat von Pat.1, Bahn 4: Stuhliolat von Pat.5, Bahn 5: Stuhliolat von Pat.6, Bahn 6: Stuhliolat von Pat.7, Bahn 7: Stuhliolat von Pat.1, Bahn 8: ZVK-Isolat von Pat.45, Bahn 9: Katheteruriniolat von Pat.3

Informationen zu den Patienten sind den Tab. 3.10 und 3.11 zu entnehmen.

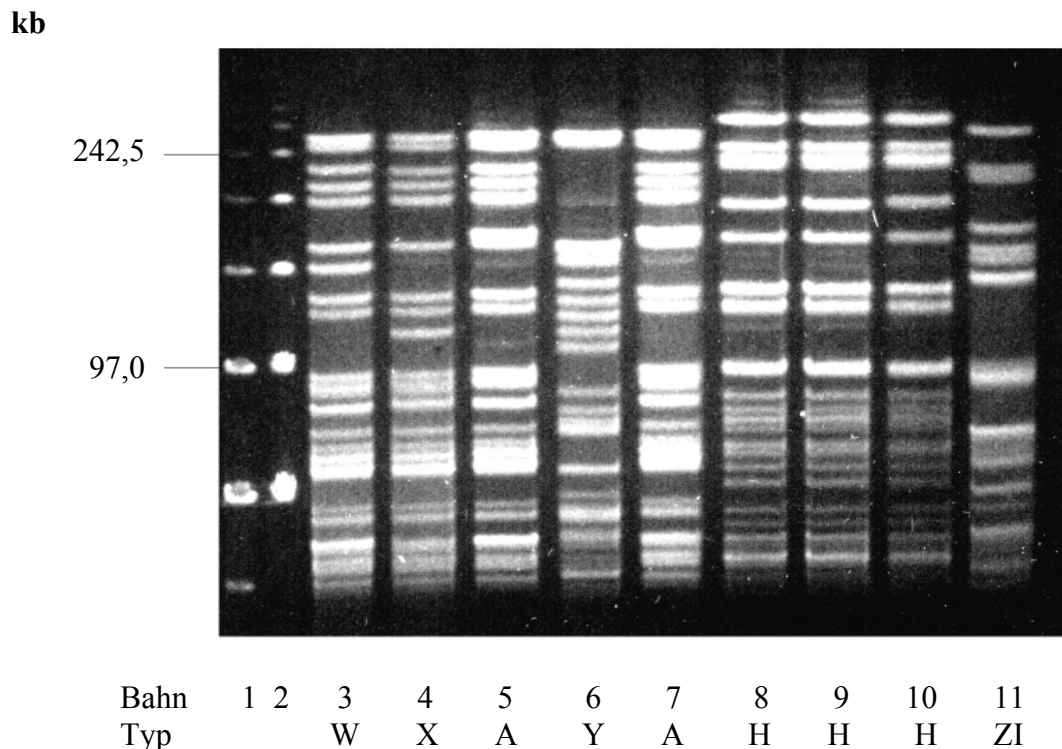


Abb. 3.4: DNA-Fragmentprofil von 9 *E. faecium*-Isolaten nach SmaI-Restriktionsverdau und PFGE.

Die Bahnen 3, 4, 6 und 11 zeigen die unterschiedlichen Bandenmuster der Isolate von Patienten aus verschiedenen Bereichen des Klinikums und von einer gesunden, nicht hospitalisierten Person. Die Bahnen 8-10 mit Isolaten aus der Chirurgie zeigen den übereinstimmenden Bandenmustertyp H, Bahnen 5 und 7 mit Isolaten aus der Kinderklinik den Bandenmustertyp A.

Bahn 1: Lambda-Ladder I = Pulsed-Field Marker 0,1-200 kb, Bahn 2: Lambda-Ladder II = Pulsed-Field Marker 50-1000 kb (beide Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Bahn 3: Stuhlisolat von Pat.46, Bahn 4: Stuhlisolat von Pat.47, Bahn 5: Stuhlisolat von Pat.4, Bahn 6: Stuhlisolat von Pat.48, Bahn 7: Stuhlisolat von Pat.2, Bahn 8: Wundabstrichisolat von Pat.25, Bahn 9: Wundabstrichisolat von Pat.26, Bahn 10: Bronchialsekretisolat von Pat.27, Bahn 11: Stuhlisolat von nicht hospitalisierter Person Nr. 68.

Informationen zu den Patienten sind den Tab. 3.10 und 3.11 zu entnehmen.

3.5.1 Kinderklinik

8 von 12 VRE-Isolaten aus der Kinderklinik, die zwischen dem 21.10.1997 und dem 31.03.1998 isoliert wurden, wiesen in der Pulsfeldgelelektrophorese ein identisches Bandenmuster auf (Typ A, siehe Tab. 3.10). Es handelte sich bei allen um *E. faecium* mit identischer biochemischer Differenzierung, die vom recht uniformen Muster der übrigen VRE-Stämme deutlich abwich. Bei allen 8 Isolaten ließ sich das vanA-Gen mittels PCR nachweisen. Die Resistenzmuster waren ebenfalls einheitlich. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den Isolaten um identische Stämme handelte.

Die 8 Isolate stammten von 7 Patienten der Kinderklinik: Zwei wurden in einer Blutkultur sowie einer Stuhlprobe von Pat.1 nachgewiesen. Pat.2, bei dem der betreffende Stamm im Stuhl auftrat, hatte mit Pat.1 ein Zimmer geteilt. Bei Pat.3 derselben Station wurde der Stamm aus Katheterurin isoliert. In Stuhlproben von den betreuenden Krankenschwestern ließen sich keine VRE nachweisen. Drei weitere Isolate entstammten Stuhlproben von Patienten der onkologischen Kinderstation, ein Isolat der Stuhlprobe eines Patienten der Frühgeborenenstation (Pat.4-7, Tab. 3.10, S. 41). Der Übertragungsweg zwischen den Stationen blieb ungeklärt.

Ein Isolat von der ZVK-Spitze eines erwachsenen Patienten der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik wies dasselbe Bandenmuster (Typ A) und dieselbe biochemische Differenzierung auf (Pat.8, Tab. 3.10). Der Zusammenhang mit den Isolaten aus der Kinderklinik blieb jedoch unklar.

Die Bandenmuster der 7 Patienten-Isolate aus der Kinderklinik sind in Abb. 3.3 (Pat.1, Pat.3, Pat.5-7) und Abb. 3.4 (Pat.2, Pat.4) wiedergegeben.

3.5.2 Medizinische Klinik, Nephrologie

In der nephrologischen Abteilung der Medizinischen Klinik wurden ebenfalls *E. faecium*-Stämme mit identischen Bandenmustern (Typen B, C, D, E), Biocodes und Antibiotogrammtypen bei 4 verschiedenen Patientengruppen isoliert (Pat.9-17, Tab. 3.10, S. 41). Auf der nephrologischen Station wurde innerhalb von zwei Monaten aus der Urinprobe einer Patientin der gleiche Stamm isoliert wie bei einem anderen Patienten aus Stuhl (Typ B). Zwei Patienten der Nierentransplantationsstation wiesen im Stuhl identische Isolate auf (Typ C). Zwei weitere untereinander identische Isolate entstammten der Stuhlprobe einer Patientin der

Nierentransplantationsstation und dem Leberpunktat einer Patientin der Transplantationsambulanz (Typ D). Ein anderes Bandenmuster trat im Dezember 1997 und im Januar 1998 bei drei nephrologischen Patienten auf (Typ E): Zwei Isolate stammten aus Stuhlproben (nephrologische Station und Nierentransplantationsstation) und eines aus Urin (Transplantationsambulanz). Bei allen hier erwähnten VRE wurde in der PCR das vanA-Gen nachgewiesen. Alle 9 Patienten hatten vor der Probenentnahme Vancomycin parenteral erhalten, zwei davon zusätzlich oral.

3.5.3 Medizinische Klinik Seltersberg, Onkologie

Zwei *E. faecium* aus Stuhlproben der Patienten 18 und 19 der onkologisch-hämatologischen Station wiesen ebenfalls ein identisches Bandenmuster auf (Typ F, Tab. 3.10). Beide zeigten den gleichen Biocode und besaßen kein vanA-Gen. Beide Patienten, bei denen die Stämme im Abstand von weniger als 3 Monaten isoliert wurden, hatten vor der Probenentnahme Vancomycin parenteral erhalten.

3.5.4 Verwandte Isolate in verschiedenen Bereichen des Klinikums

Das Bandenmuster G trat bei drei *E. faecium* aus Stuhlproben unterschiedlicher Patienten der onkologisch-hämatologischen Station auf (Pat.20-22, Tab. 3.10, S. 41). Dasselbe Muster wiesen Isolate vom Abstrich aus der subkutanen Herzschrittmachertasche von Pat.23 (Kardiologie) und aus Mittelstrahlurin von Pat.24 (Nephrologie) auf. Die Proben wurden im Zeitraum von weniger als 9 Monaten entnommen. Bei Pat.24 ließ sich derselbe Stamm 11 Monate später erneut im Urin nachweisen. Vor Entnahme der ersten Probe hatte er Vancomycin parenteral und oral erhalten, vor Abgabe der zweiten Urinprobe erneut parenteral. Alle 6 Isolate zeigten ein identisches biochemisches Verhalten und ein einheitliches Resistenzmuster und besaßen das vanA-Gen.

Von vier in der chirurgischen Klinik isolierten VRE wiesen drei in der Pulsfeldgelelektrophorese ein identisches Bandenmuster auf (Typ H, April bis Juli 1998). Ein Isolat stammte aus Bronchialsekret, die anderen aus Wundabstrichen (Pat.25-27, Tab. 3.10). Dasselbe Bandenmuster zeigten aber auch vier weitere *E. faecium*, die von verschiedenen Patienten zwischen Januar und Juli 1998 aus folgendem Material isoliert wurden: je eine Stuhlprobe aus der Onkologie und der Nephrologie, Katheterurin aus der neurologischen Intensivstation und ein

Vaginalabstrich aus der medizinischen Intensivstation. Der Biocode und das Resistenzprofil waren bei allen Stämmen identisch und das vanA-Gen wurde bei allen untersuchten VRE nachgewiesen. Die Bandenmuster der Isolate der Patienten 25 bis 27 sind in Abb. 3.4 auf S. 44 abgebildet (Bahnen 8-10).

4 DISKUSSION

Resistenzentwicklungen bei bakteriellen Krankheitserregern stellen in den Krankenhäusern vieler Länder ein schwerwiegendes Problem dar. Zu den Problemkeimen mit zum Teil multiplen Resistenzen gegen alle herkömmlichen Antibiotika gehören auch die Enterokokken. Besonders bedenklich ist die zuerst 1988 beschriebene und seitdem immer häufiger aufgetretene Resistenz gegen die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin, denn diese sind wichtige Reserveantibiotika gegen multiresistente grampositive Krankheitserreger (41, 89). Dabei ist die Resistenzrate von *E. faecium* unter allen Enterokokkenspezies am höchsten (80). Auch bei den hier isolierten Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) war *E. faecium* mit 96% der Isolate am häufigsten vertreten.

VRE werden nicht nur bei Krankenhauspatienten, sondern auch aus Stuhlproben nicht hospitalisierter Personen isoliert. In Deutschland wurde 1995 von Kolonisationsraten der Bevölkerung bis zu 12% berichtet (34, 87). Als eine Ursache für die hohen Raten wurde der nutritive Einsatz des Glykopeptidantibiotikums Avoparcin in der Tiermast angeführt. Im Auftauwasser von Schlachtgeflügel und in Rohfleischprodukten wurden VRE nachgewiesen, die über die Nahrungskette den Menschen erreichen können (35, 85). VRE wurden häufiger in Mastbetrieben gefunden, die Avoparcin einsetzten, als in solchen, die es nicht als Futterzusatz benutzten (1, 34, 35, 87, 89). Seit dem Verbot des Avoparcineinsatzes in der Fleischproduktion in Deutschland im Januar 1996 ist die Nachweishäufigkeit von VRE dort zurückgegangen (71).

In den vorliegenden Untersuchungen, durchgeführt im Raum Gießen von September 1996 bis März 1998, wurden aus 0,7% der Stuhlproben von gesunden, nicht hospitalisierten Personen VRE isoliert. Dies liegt unter den bisher für die 90er Jahre veröffentlichten Zahlen (34, 87). Die Unterschiede zu anderen Studien können zwei Gründe haben: Erstens stammten die Proben aus anderen Regionen, zweitens wurde unsere Studie nach dem Verbot von Avoparcin in Deutschland durchgeführt. Klare et al. beobachteten 1995 vor dem Verbot von Avoparcin in der Tiermast 12% asymptomatische Träger von VRE unter der nicht hospitalisierten Allge-

meinbevölkerung. 1997, ein Jahr nach dem Verbot, berichteten sie von einem Absinken dieser Rate auf 3,3% (36). Diese Feststellungen unterstreichen die Bedeutung des Einsatzverbotes von Antibiotika als Futterzusatz in der Fleischproduktion.

Um die Verbreitung der Vancomycinresistenz in Krankenhäusern zu beurteilen, wird in den meisten Studien der Anteil der VRE an allen Enterokokkenisolaten aus Infektionen bestimmt. Eine deutsche multizentrische Studie weist für 1997 eine Resistenzrate von 4,3% gegen Glykopeptide bei Enterokokken klinischer Herkunft aus (74). Aus den USA wird 1997 von einer Glykopeptidresistenzrate von 23% bei Enterokokkenisolaten von Intensivpatienten und von 15% auf Normalstationen berichtet (37). Im Untersuchungszeitraum betrug der Anteil von VRE an allen Enterokokken-Isolaten des Gesamtklinikums Gießen 2-3%.

Als Ausgangsquelle für VRE-Infektionen ist die intestinale Kolonisation anzusehen (19, 24, 49). In den meisten Fällen bleiben diese Kolonisationen symptomlos. Es besteht jedoch immer die Gefahr, dass diese fakultativ pathogenen Keime in andere Organe gelangen (Harnwege, Venenkatheter, Peritonealraum, Blut, Herzklappen) und dort Infektionen verursachen, die dann nur schwierig und teuer zu therapieren sind.

Als Risikofaktoren für eine VRE-Kolonisation werden in der Literatur die Grunderkrankung der Patienten, eine vorausgegangene Antibiotikatherapie insbesondere mit Glykopeptiden und die Verweildauer im Krankenhaus diskutiert. Besonders hoch ist das Risiko bei Patienten mit Grunderkrankungen, bei denen häufiger eine Therapie mit Glykopeptiden erforderlich ist (88). Entsprechend ist die Gefahr auf nephrologischen und hämatologischen Stationen sowie auf Intensivstationen besonders hoch. In der Literatur wurden dort 10-33% kolonisierte Patienten beschrieben (23, 25, 30, 89), während in anderen Bereichen dieser Anteil bei 3-5% lag (23, 89). Diese Daten ließen sich in unseren Untersuchungen bestätigen. Bei 29 der 370 untersuchten Patienten des Gießener Universitätsklinikums ließen sich VRE in Stuhlproben nachweisen (7,8%). Am höchsten war die Kolonisationsrate auf den nephrologischen Stationen (26%) und in der Onkologie/Hämatologie (25% in der Pädiatrie, 9% in der Medizinischen Klinik). Auf den übrigen Stationen waren im Mittel nur 3% der Patienten mit VRE kolonisiert.

Als eine der Ursachen für die unterschiedliche Häufigkeit der VRE-Kolonisation sind die therapeutische Anwendung von Glykopeptiden und anderen Breitbandantibiotika diskutiert worden (10, 22, 25, 85). Vancomycin wird nach parenteraler Gabe hauptsächlich renal eliminiert, gelangt aber in niedriger Konzentration über die Galle auch in den Darm und kann dort ein Niveau erreichen, das Vancomycin-resistenten Keimen einen Wachstumsvorteil verschafft (17, 38). Die orale Gabe von Vancomycin wird zur Therapie der durch *Clostridium difficile* verursachten Antibiotika-assoziierten Kolitis eingesetzt und wurde von mehreren Autoren als ein Risikofaktor für die intestinale Kolonisation mit VRE beschrieben (10, 26, 69, 81). In unseren Untersuchungen hatten 34% der Patienten zuvor Vancomycin erhalten, davon 88% parenteral, 9% oral und 3% oral und parenteral. Die Vancomycintherapie erfolgte in 90% der Fälle innerhalb der letzten zwei Wochen vor der Stuhluntersuchung, bei allen anderen innerhalb der letzten 4 Wochen.

Nach unseren Untersuchungsergebnissen steigt das Risiko der intestinalen Kolonisation eines Patienten mit VRE während eines stationären Aufenthaltes auf das Dreifache an, wenn er mit Vancomycin therapiert wurde. Die Grunderkrankung der Patienten konnte in unseren Untersuchungen nicht als statistisch signifikanter Risikofaktor belegt werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Bereichen des Klinikums sind am ehesten durch den unterschiedlich häufigen Einsatz von Vancomycin in der Therapie zu erklären. Ein bedeutender Einfluss der sonstigen antibiotischen Therapie auf die Besiedlung mit VRE konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Einhaltung strenger Indikationsstellungen für den therapeutischen Einsatz von Glykopeptidantibiotika. Diese Antibiotika sollten nur bei bestimmten Indikationen Anwendung finden (16, 26, 28, 75, 81), die nachfolgend aufgezählt sind:

- Behandlung schwerer Infektionen durch Betalaktam-resistente grampositive Bakterien
- Behandlung von Infektionen durch grampositive Mikroorganismen bei Patienten mit Allergien gegen Betalaktam-Antibiotika
- Behandlung therapieresistenter Antibiotika-assoziiierter Kolitis (orale Applikation von Vancomycin), Mittel der ersten Wahl sollte Metronidazol sein

- Endokarditis-Prophylaxe bei Hochrisikopatienten
- perioperative Prophylaxe bei Implantation prothetischer Materialien in Krankenhäusern mit einer hohen Rate Methicillin-resistenter Staphylokokken

In der Krankenhausroutine wird leider häufig gegen dieses Prinzip verstoßen. Verschiedene Studien zeigen, dass bis zu zwei Drittel der Patienten, die Vancomycin erhalten, keine ausreichende Indikation für diese Therapie aufweisen (19, 28, 81).

Welche Therapieoptionen bleiben bei Infektionen mit multiresistenten Enterokokken? Die klassische Therapie mit einem Aminopenicillin, auch in Kombination mit einem Betalaktamase-Inhibitor, scheidet in der Regel aus. Nur 24% der untersuchten Stämme waren noch sensibel gegen Amoxicillin mit Clavulansäure. Die Hälfte der VRE wies zudem eine Hochresistenz gegen Gentamicin auf, so dass auch durch Kombination mit einem Aminoglykosid keine synergistische Wirkung erzielt werden kann.

Eine Therapie mit Teicoplanin ist bei Isolaten mit dem selteneren Resistenzgen vanB oft noch möglich (37, 89). Der VanA-Typ, der eine hohe Resistenz gegen Teicoplanin aufweist, ist jedoch weitaus häufiger: Bei 82% der untersuchten VRE ließ sich das vanA-Gen nachweisen. Das stimmt überein mit der in der Literatur angegebenen Häufigkeit von vanA von 70-100% (20, 48, 49).

In einigen Fällen zeigt Rifampicin in vitro eine noch ausreichende Aktivität gegen VRE (18%), es wirkt aber nicht bakterizid. Außerdem besteht bei einer Monotherapie die Gefahr der schnellen Resistenzentwicklung. Rifampicin sollte daher nur in Kombination mit anderen Antibiotika, z.B. Chloramphenicol, angewendet werden (25, 52, 81).

Eine weitere Alternative sind nach Testung Chloramphenicol oder Tetracycline. Von den hier untersuchten Enterokokken waren 58% sensibel gegen Chloramphenicol. Beide Antibiotika sind jedoch nur bakteriostatisch wirksam und sollten daher mit anderen Mitteln kombiniert werden (40, 58, 81). Wegen der seltenen, aber meist irreversiblen Knochenmarksschädigung darf Chloramphenicol nur nach kritischer Indikationsstellung eingesetzt werden (32).

Unter den neu entwickelten Antibiotika haben das Streptogramin Dalfopristin/Quinupristin und das Oxazolidinon Linezolid eine besondere Bedeutung. In Untersuchungen von Eliopoulos et al. waren 1997 86% von 875 nordamerikanischen Vancomycin-resistenten *E. faecium* sensibel gegen Dalfopristin/Quinupristin (20). Das stimmt mit unseren Ergebnissen überein: Bei den von uns untersuchten Enterokokkenisolaten waren ebenfalls nur 14% resistent. Allerdings droht auch hier eine Resistenzentwicklung aus der Tiermast: Das verwandte Antibiotikum Virginiamycin wurde über 20 Jahre als Futterzusatz eingesetzt und wurde in der EU erst im Januar 1999 verboten, weil Resistenzprobleme auftraten (71, 86). Dalfopristin/Quinupristin ist zudem schlecht verträglich. Es hat zahlreiche Nebenwirkungen, u.a. ist es stark phlebotoxisch. Es darf daher nur stark verdünnt über einen zentralen Venenkatheter appliziert werden, da sonst bis zu 40% der Patienten eine Thrombophlebitis entwickeln (2, 44, 82). Es sollte daher nur in Notfällen angewandt werden.

Die wichtigste Therapieoption ist das neu entwickelte und seit September 2001 in Deutschland zugelassene Oxazolidinon Linezolid. Es ist gut verträglich und zeigt eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien, inklusive multiresistenter Keime wie VRE, MRSA und VRSA. Es verfügt über einen neuartigen Wirkmechanismus; Resistenzen wurden bisher nicht beschrieben. Linezolid ist derzeit die beste Alternative zur Therapie multiresistenter Enterokokken und anderer multiresistenter grampositiver Krankheitserreger (7, 14, 51). Ein Nachteil ist der erschreckend hohe Preis, mit Tagestherapiekosten von derzeit 140-200 Euro¹.

Einige In-vitro-Untersuchungen weisen darauf hin, dass antibiotische Mehrfachkombinationen synergistisch gegen multiresistente Enterokokken wirksam sind. Die Kombination von Teicoplanin mit Ampicillin führt zu einer Wirkungsverstärkung der einzelnen Antibiotika gegen VRE (29), während die Kombination von Daptomycin und Fosfomycin synergistische bakterizide Aktivität gegen Enterokokken mit Hochresistenz gegen Gentamicin zeigt (64). Auch über Kombinationen von Vancomycin mit Penicillin und Gentamicin oder Teicoplanin mit Imipenem wird berichtet. Allerdings zeigt sich klinisch noch keine Kombination als ausreichend zuverlässig (40, 52, 81).

¹ Quelle: Dr. M. Brumhard, Leiter der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen

Eine Therapiemöglichkeit bei Wundinfektionen stellt die lokal applizierbare Fusidinsäure dar (18, 78). Gegen 24% der untersuchten VRE wies Fusidinsäure eine ausreichende In-vitro-Aktivität auf.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit galt der Epidemiologie von VRE im Klinikum Gießen. Mittels Restriktionsverdau und Pulsfeldgelelektrophorese wurde eine Genotypisierung der Enterokokkenstämme durchgeführt, die Aufschluss über die klonale Identität der Isolate lieferte.

Zum Nachweis der Identität von Bakterienisolaten werden verschiedene Methoden angewendet. Eine Möglichkeit ist die Biotypisierung und der Vergleich der Antibigramm-Muster. Diese Methoden haben den Nachteil, dass bei manchen Bakterienarten nur wenig Abweichungen zwischen den Stämmen bestehen, d.h. die Muster aller Stämme sehen ähnlich oder gleich aus (47). Die zuverlässigste Methode ist der „genetische Fingerabdruck“, z.B. mittels Restriktionsverdau mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese. Durch Vergleich der Bandenmuster kann die klonale Identität eines Stammes bewiesen oder ausgeschlossen werden (11, 12, 47, 77).

Es gibt zur Zeit jedoch noch keine standardisierten Kriterien für die Analyse von Bandenmustern, die in der PFGE erzeugt werden. Tenover et al. vom CDC, Georgia, USA, haben Richtlinien für diese Analysen veröffentlicht (77): Eine Voraussetzung für den zuverlässigen Vergleich ist zunächst, dass in der PFGE mindestens 10 Banden differenziert werden können. Um zu gewährleisten, dass nicht verwandte Stämme sicher voneinander differenziert werden können, müssen zudem einige epidemiologisch voneinander unabhängige Stämme untersucht werden, die ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster aufweisen müssen. Dies ist bei den vorliegenden Untersuchungen durch die Typisierung von VRE von gesunden Personen außerhalb des Klinikums geschehen. Auch bei den Patienten des Klinikums wurden VRE mit verschiedenen Bandenmustern isoliert. Insgesamt wurden 43 verschiedene Muster identifiziert. Klare et al. berichten in Deutschland, ebenso wie van den Braak et al. in den Niederlanden, von einer hohen Diversität der von ihnen mittels PFGE typisierten Enterokokken (13, 34). Daher kann man davon ausgehen, dass Stämme mit gleichen Bandenmustern identisch sind.

Exakt identische Bandenmuster stehen nach Tenover et al. für genetische Identität, d.h. die jeweiligen Isolate gehören zu demselben Stamm. Unterscheiden sich die Muster in zwei bis

drei DNA-Banden, werden die entsprechenden Isolate nach diesen Richtlinien noch als wahrscheinlich demselben Stamm zugehörig eingestuft. Um zweifelsfreie Aussagen treffen zu können, wurde diese zweite Kategorie in der Bewertung der Muster nicht berücksichtigt. Diese Richtlinien gelten für Isolate, die innerhalb eines Zeitraumes von höchstens 12 Monaten aufgetreten sind. Die im Ergebnisteil als identisch eingestuften Isolate erfüllen diese Forderung. Für die Genotypisierung größerer Erregerpopulationen, die über längere Zeiträume isoliert werden, wird die Genomspaltung mittels mehrerer Restriktionsendonukleasen gefordert. Da für Enterokokken zur Zeit nur eine anerkannte Restriktionsendonuklease existiert – SmaI – ist dies noch nicht möglich (34, 47, 54, 77).

Die VRE-Isolate von gesunden Personen außerhalb des Klinikumsbereichs waren erwartungsgemäß untereinander nicht verwandt. Bei mehreren Patienten des Klinikums konnten dagegen nah verwandte oder sogar identische Stämme isoliert werden. Diese Patienten befanden sich zum großen Teil jeweils im gleichen Bereich des Klinikums, einige davon auf denselben Stationen. Hier muss von einer Ausbreitung der Keime ausgegangen werden, die bei Einhaltung adäquater Hygienemaßnahmen jedoch vermeidbar sein sollte. Zwei Genotypen wurden außerdem bei Patienten aus unterschiedlichen Bereichen des Klinikums isoliert: Typ G trat in verschiedenen Bereichen der Medizinischen Klinik auf, während Typ H bei mehreren Patienten der Chirurgischen Klinik und der Medizinischen Klinik und bei einem Patienten der neurologischen Intensivstation isoliert wurde. Mögliche Übertragungswege sind der Transfer von Patienten in andere Kliniken oder Personal, das in mehreren Bereichen des Klinikums arbeitet, sowie die gemeinsame Benutzung von Bereichen wie Radiologie etc. Diese Erkenntnisse weisen erneut daraufhin, wie wichtig die strikte Einhaltung von Hygiene- und Isolierungsmaßnahmen zur Vermeidung der Ausbreitung multiresistenter Infektionserreger ist.

Nosokomiale Infektionen durch VRE werden nicht nur in Gießen beobachtet. In zahlreichen Veröffentlichungen aus Europa und den USA wird von nosokomialen Kleinraumepidemien mit jeweils identischen VRE-Isolaten berichtet (3, 11, 12, 16, 22, 30, 42, 48). So isolierten Boyce et al. von 1991 bis 1992 bei 37 Patienten auf 8 von 10 Abteilungen eines Krankenhauses in Rhode Island einen identischen VanB-positiven Stamm. 15 dieser Patienten entwickelten eine Infektion mit diesem Keim (11). In Boston kam es 1996 zur Ausbreitung eines im Massachusetts General Hospital schon bei zahlreichen Patienten nachgewiesenen VRE-Stammes auf ein weiteres Krankenhaus. Innerhalb von drei Monaten wurde der identi-

sche Stamm dort bei 39 von 75 Patienten mit VRE-Infektionen isoliert (22). Jordens et al. untersuchten 1992 VRE-Isolate von 22 Patienten eines englischen Krankenhauses, von denen sich 17 als identisch herausstellten. Bei einem anschließenden Screening wurden aus 17 von 25 VRE-positiven Stuhlproben Stämme mit demselben Genotyp isoliert (30).

Um das Problem multiresistenter VRE künftig einzudämmen, müssen Maßnahmen ergriffen werden, die an unterschiedlichen Stellen angreifen. Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen und den Daten aus der Literatur lassen sich die folgenden Empfehlungen ableiten.

An erster Stelle steht die Einschränkung des Vancomycinverbrauches. Glykopeptide sollten nur nach strenger Indikationsstellung angewendet werden. Insbesondere die orale Applikation von Vancomycin zur Therapie der Antibiotika-assoziierten Kolitis sollte vermieden und stattdessen Metronidazol bevorzugt werden. Antibiotika, darunter speziell die Glykopeptide, müssen weltweit aus der Tiermast verbannt werden. Innerhalb von Krankenhäusern muss die Gefahr der Übertragung multiresistenter Keime durch die strikte Einhaltung von Hygiene- und Isolierungsmaßnahmen vermieden werden. Patienten mit VRE sollten in Risikobereichen im Einzelzimmer mit eigener Toilette untergebracht werden. Patient, Pflegepersonal und behandelnde Ärzte sollten besondere Hygienemaßnahmen beachten, insbesondere die korrekte Händedesinfektion vor Verlassen des Zimmers. Der Patient muss über entsprechende Verhaltensregeln aufgeklärt werden.

Mit der Zulassung neuartiger Antibiotika wie des Linezolid ist es gelungen, Infektionen mit multiresistenten grampositiven Keimen wieder therapierbar zu machen, wenn auch zu einem hohen Preis. Das sollte nicht dazu verleiten, künftig die oben aufgeführten Präventionsmaßnahmen zu vernachlässigen, die einer weiteren Resistenzentwicklung und Verbreitung multiresistenter Erreger vorbeugen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch zunehmende Resistenzentwicklungen sind besonders die Enterokokken zu schwer therapierbaren Krankheitserregern geworden. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) weisen gegen nahezu alle herkömmlichen Antibiotika, inklusive der Glykopeptide, Resistenzen auf. Ausgangspunkt für Infektionen ist die intestinale Kolonisation. In der vorliegenden Arbeit wurden Prävalenz und Risikofaktoren der intestinalen Kolonisation mit VRE bei nicht hospitalisierten Personen und Patienten des Universitätsklinikums Gießen untersucht.

Aus 1252 Stuhlproben von gesunden, nicht hospitalisierten Personen wurden in 9 Fällen VRE isoliert (0,7%). Bei 29 von 370 Patienten des Universitätsklinikums Gießen konnten aus Stuhlproben VRE isoliert werden (7,8%). In der Nephrologie lag diese Rate bei 26%, auf der onkologisch-hämatologischen Kinderstation bei 25%, auf der onkologisch-hämatologischen Erwachsenenstation bei 9% und auf den übrigen Stationen im Mittel bei 3%. Eine vorherige Vancomycintherapie konnte als statistisch signifikanter Risikofaktor ermittelt werden. Der Einfluss einer anderweitigen antibiotischen Therapie und der Grunderkrankung der Patienten waren statistisch nicht belegbar.

Bei 82% der VRE ließ sich mittels PCR das Resistenzgen *vanA* nachweisen. Durch molekulare Genotypisierung mittels Restriktionsverdau und anschließende Auftrennung der Fragmente in der Pulsfeldgelelektrophorese sowie durch Vergleich von Biocode und Resistenzmuster ließ sich die Identität bzw. Unterschiedlichkeit der Stämme darstellen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Ausbreitung verwandter Stämme innerhalb des Klinikums stattgefunden hat. So konnte unter anderem in der Kinderklinik ein klonal verwandter Stamm bei mehreren Patienten aus Blut, Urin und Stuhl isoliert werden.

Wichtige Präventionsmaßnahmen zur Verhinderung der weiteren Resistenzausbreitung sind daher die Verringerung des Glykopeptideinsatzes und besondere Hygiene- und Isolierungsmaßnahmen bei infizierten und kolonisierten Patienten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aarestrup F.M. et al. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (7):2054-2059.
2. Allington D.R., M.P. Rivey. 2001. Multiple-dose pharmacokinetics and safety of two regimens of quinupristin/dalfopristin (Synercid) in healthy volunteers. *Clin. Ther.* 23 (1):24-44.
3. Anonymous. 1996. Zum Problem der vancomycinresistenten Enterokokken (VRE). *Epidem. Bulletin des RKI* 6:39-40.
4. Appelbaum P.C., M.R. Jacobs, W.M. Palko, E.E. Fraunhoffer, A. Duffett. 1986. Accuracy and reproducibility of the IDS RapID STR system for species identification of streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 23 (5):843-846.
5. Arthur M., C. Molinas, P. Courvalin. 1992. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 174 (4):2582-2591.
6. Ausubel et al. 1990. *Current protocols in molecular biology*. Chichester, John Wiley, Vol. 1: Kap. 2.4.1.
7. Bain K.T., E.T. Wittbrodt. 2001. Linezolid for the treatment of resistant gram-positive cocci. *Ann. Pharmacother.* 35 (5):566-575.
8. Baker C.N., S.A. Stocker, D.H. Culver, C.Thornsberry. 1991. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 29 (3):533-538.
9. Becton Dickinson (Hrsg.). 1994. *Handbuch BBL Nährmedien*. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg: S. 55f, 74-76.
10. Boyce J.M. 1997. Vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Inf. Dis. Clinics of N. America* 11 (2):367-384.
11. Boyce J.M. et al. 1994. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class Vancomycin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 32 (5):1148-1153.
12. Boyle J.F. et al. 1993. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of Vancomycin-resistant *Enterococci*. *J. Clin. Microbiol.* 31 (5):1280-1285.
13. Braak N. van den et al. 1998. Molecular characterization of Vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in the netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 36 (7):1927-1932.

14. Brauers J. 2001. Linezolid - Profil eines neuen Antibiotikums. *Chemother. J.* 10, Beilage 15:1-6.
15. Candrian U. 1994. Die Polymerase-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 85:704-718.
16. Chadwick P.R., B.A. Oppenheim. 1997. Controlling glycopeptide-resistant enterococci. *Clinical Microbiology and Infection* 3 (1):7-11.
17. Cooper G.L., D.B. Given. 1986. Vancomycin – a comprehensive review of 30 years of clinical experience. Park Row Publishers, USA: S. 1, 7f.
18. Drugeon H.B., J. Caillon, M.E. Juvin. 1994. In-vitro antibacterial activity of fusidic acid alone and in combination with other antibiotics against methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 34 (7):899-907.
19. Edmond M.B. et al. 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: Risk factors for infection. *Clin. Inf. Dis.* 20 (5):1126-1133.
20. Eliopoulos G.M. et al. 1998. Characterization of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from the United States and their susceptibility in vitro to Dalfopristin-Quinupristin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (5):1088-1092.
21. Facklam R.R., M.D. Collins. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27 (4):731-734.
22. Fridkin S.K., D.S. Yokoe, C.G. Whitney, A. Onderdonk, D.C. Hooper. 1998. Epidemiology of a dominant clonal strain of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at separate hospitals in Boston, Massachusetts. *J. Clin. Microbiol.* 36 (4):965-970.
23. Gordts B. et al. 1995. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* 33 (11):2842-2846.
24. Green M., R.M. Wadowsky, K. Barbadora. 1990. Recovery of Vancomycin-resistant gram-positive cocci from children. *J. Clin. Microbiol.* 28 (3):484-488.
25. Guiot H.F.L., W.E. Peetermans, F.W. Siebens. 1991. Isolation of Vancomycin-resistant enterococci in haematologic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:32-34.
26. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. 1995. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 16:105-113.
27. Ieven M., E. Vercauteren, P. Descheemaeker, F. van Laer, H. Goossens. 1999. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* 37 (5):1436-40.

28. Jarvis W.R. 1998. Epidemiology, appropriateness, and cost of Vancomycin use. *Clin. Inf. Dis.* 26 (5):1200-1203.
29. Jones N.R., S.A. Marshall, H. Grimm. 1997. Antimicrobial interactions (synergy) of teicoplanin with two broad-spectrum drugs (cefotaxime, ofloxacin) tested against gram-positive isolates from Germany and the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29 (7):87-94.
30. Jordens J.Z., J. Bates, D.T. Griffiths. 1994. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 34 (4):515-528.
31. Kaplan A.H., P.H. Gilligan, R.R. Facklam. 1988. Recovery of resistant enterococci during Vancomycin prophylaxis. *J. Clin. Microbiol.* 26 (6):1216-1218.
32. Karow T., R. Lang. 1999. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie*. F. Hansen, Bergisch-Gladbach-Köln, 7.Auflage: S. 535.
33. Kayser F.H., K.A. Bienz, J. Eckert, J. Lindenmann. 1993. *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart-New York, 8. Auflage.
34. Klare I. et al. 1995. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb. Drug Resist.* 1 (3):265-272.
35. Klare I. et al. 1995. vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiology Letters* 125 (11):165-172.
36. Klare I., D. Badstübner, C. Konstabel, G. Böhme, H. Claus, W. Witte. 1999. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb. Drug Resist.* 5 (1):45-52.
37. Klare I., D. Badstübner, C. Konstabel, G. Werner, W. Witte. 1999. Enterokokken mit Glykopeptidresistenz. *Mikrobiologie* 9:211-217.
38. Kureishi A. et al. 1992. Das nephrotoxische Potential von Teicoplanin im Vergleich zu Vancomycin bei der empirischen Behandlung von neutropenischen Patienten. *Fortschr. der antimikrob. u. antineoplast. Chemotherapie* 11 (5):677-688.
39. Landman D. et al. 1996. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of Vancomycin-resistant *Enterococci*. *J. Clin. Microbiol.* 34 (3):751-752.
40. Landman D., J.M. Quale. 1997. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:161-170.
41. Leclercq R., E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* 319:157-161.
42. Liassine N., R. Frei, I. Jan, R. Auckenthaler. 1998. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococci* from a Swiss hospital. *J. Clin. Microbiol.* 36 (7):1853-1858.

43. Lorenz R.J. 1996. Grundbegriffe der Biometrie. Gustav Fischer, 4. Auflage: S. 67-74.
44. Manzella J.P. 2001. Quinupristin-dalfopristin: a new antibiotic for severe gram-positive infections. *Am. Fam. Physician* 64 (11):1863-1866.
45. Medicine Worldwide. 2001. Teicoplanin. Online im Internet: <http://www.m-ww.de/pharmakologie/arzneimittel/antiinfektiva/antibiotika/teicoplanin.html> (Stand: 28.09.2002)
46. Milatovic D., I. Braveny. 1995. Infektionen. Praktische Hinweise zur antimikrobiellen Therapie und Diagnostik. Vieweg, Braunschweig-Wiesbaden, 5. erweiterte Auflage: S. 144f, 173.
47. Miranda A.G., K.V. Singh, B.E. Murray. 1991. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J. Clin. Microbiol.* 29 (12):2752-2757.
48. Moellering R.C. 1998. Vancomycin-resistant Enterococci. *Clin. Inf. Dis.* 26 (5):1196-1199.
49. Montecalvo M.A. et al. 1994. Outbreak of Vancomycin-, Ampicillin-, and Aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (6):1363-1367.
50. Morguet A.J., M. Bökemeier, H. Kreuzer. 1995. Infektiöse Endokarditis nativer und prothetischer Klappen. *Dtsch. med. Wschr.* 120:1191-1196.
51. Mouton J.W., A.R. Jansz. 2001. The DUEL study: a multi-center in vitro evaluation of linezolid compared with other antibiotics in the Netherlands. *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (9):486-491.
52. Murray B.E. 1990. The life and times of the enterococcus. *Clinical Microb. Reviews* 3 (1):46-65.
53. Murray B.E. 1995. Editorial response: What can we do about Vancomycin-resistant enterococci? *Clin. Inf. Dis.* 20 (5):1134-1136.
54. Murray B.E. et al. 1990. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J. Clin. Microbiol.* 28 (9):2059-2063.
55. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 5th ed. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, USA.
56. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 3rd ed. Approved standard M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, USA.

57. Noble W.C., Z. Virani, R.G.A. Cree. 1992. Co-transfer of vancomycin resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 72 (2):195-198.
58. Norris A.H. et al. 1995. Chloramphenicol for the treatment of Vancomycin-resistant enterococcal infections. *Clin. Inf. Dis.* 20 (5):1137-1144.
59. Noskin G.A., L.R. Peterson, J.R. Warren. 1995. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bacteremia: acquisition and outcome. *Clin. Inf. Dis.* 20 (2):296-301.
60. Poyart C. et al. 1997. Emergence of Vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: Characterization of an *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1):24-29.
61. Pschyrembel W. (Hrsg.). 1994. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, Berlin-New York, 257. Auflage: S. 1476, 1610.
62. Pschyrembel W. (Hrsg.). 1994. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, Berlin-New York, 257. Auflage: S. 224-225, 1516.
63. Reacher M.H., A. Shah, D.M. Livermore et al. 2000. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. *BMJ* 320:213-216.
64. Rice L.B., G.M. Eliopoulos, R.C. Moellering. 1989. In vitro synergism between Daptomycin and Fosfomycin against *Enterococcus faecalis* isolates with high-level Gentamicin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (4):470-473.
65. Rice L.B., L.L. Carias, C.L. Donskey, S.D. Rudin 1998. Transferable, plasmid-mediated *vanB*-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (4):963-964.
66. Sachs L. 1997. *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*. Springer, Berlin. 8.Auflage: S. 571-576.
67. Sambrook J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second edition.
68. Schaberg D.E., and M.J. Zervos. 1986. Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 (6):817-822.
69. Schentag J.J. et al. 1998. Genesis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), how treatment of MRSA infections has selected for Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and the importance of antibiotic management and infection control. *Clin. Inf. Dis.* 26 (5):1204-1214.
70. Schulz J.E., D.F. Sahm. 1993. Reliability of the E Test for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 31 (12):3336-3339.

71. Schwarz S., C. Werckenthin. 2001. Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion. *Chemother. J.* 6:197-202.
72. Söller R. 1999. Special: Polymerase-Kettenreaktion. *Biospektrum* 5 (6):478-499.
73. Speller D.C.E., W.A. Lynn, T.R. Rogers. 1995. Glycopeptide resistance in gram-positive bacteria. *Journal of Clin. Microb. and Inf.* 1 (1):54-57.
74. Stock I., K. Machka, B. Wiedemann et al. 2001. Resistenzsituation aerober und fakultativ anaerober klinischer Bakterienisolate. *Chemother. J.* 1:1-19.
75. Stosor V., G.A. Noskin, L.R. Peterson. 1996. The Management and prevention of Vancomycin-resistant enterococci. *Infections in Medicine* 13 (6):487-488,493-498.
76. Swenson J.M., B.C. Hill, C. Thornsberry. 1989. Problems with the disk diffusion test for detection of Vancomycin resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 27 (9):2140-2142.
77. Tenover F.C. et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33 (9):2233-2239.
78. Toma E., D. Barriault. 1995. Antimicrobial activity of fusidic acid and disc diffusion susceptibility testing criteria for gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.* 33 (7):1712-1715.
79. Traub W.H., I. Kleber. 1974. Interpretation of diffusion susceptibility data obtained with 10-microgramme Fucidin (Sodium Fusidate) disks against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 20: 92-96.
80. Wallrauch C. et al. 1997. Antibiotikaresistenz der Enterokokken in Deutschland. *Medizinische Klinik* 92 (8):464-468.
81. Wendt C., H. Rüden, M. Edmond 1998. Vancomycin-resistente Enterokokken. *Dt Ärztebl* 95 (6):A-1604-1611.
82. Widmer H.R. 2002. *Arzneimittel Brevier Inselspital Bern. Documed, Bern*, 14.Auflage: S. 384.
83. Wiedemann B. 1992. Häufigkeit der Resistenz gegenüber Glykopeptiden – was bedeutet sie in der Praxis? *FAC Band* 11-5:581-583.
84. Willey B.M. et al. 1992. Detection of Vancomycin resistance in *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 30 (7):1621-1624.
85. Witte W. 1997. Wie groß ist das Gefährdungspotential durch Vancomycin-resistente Enterokokken? *Dtsch. med. Wschr.* 122:1161-1163.
86. Witte W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279 (2):996-997.

87. Witte W., I. Klare, G. Werner. 1998. Glykopeptid-Resistenz bei Enterokokken. *Chemotherapie Journal* 7 (2):50-52.
88. Witte W., I. Klare. 1999. Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. *Bundesgesundheitsbl.* 42:8-16.
89. Woodford N., A.P. Johnson, D.Morrison, D.C.E. Speller. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clinical Microb. Reviews* 8 (4):585-615.
90. You M.S., R.R. Facklam. 1986. New test system for identification of *Aerococcus*, *Enterococcus*, and *Streptococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 24 (4):607-611.

Danksagung

Frau PD Dr. med. vet. R. Füssle, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, danke ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität möchte ich mich herzlich für ihre stets hilfsbereite Art bedanken.

Herrn W. Pabst, Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität (Leiter: Prof. Dr. J. Dudeck), danke ich für die Durchsicht und statistische Auswertung des Datenmaterials.

Herrn Prof. Dr. med. vet. M. Bülte, Veterinärmedizinisches Institut der Justus-Liebig-Universität, möchte ich ganz besonders für die gute Kooperation und die Überlassung von Material und Geräten für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen danken.

Herrn Dr. med. vet. R. Lemcke bin ich sehr dankbar für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellung bei allen molekularbiologischen Methoden.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium und die Durchführung dieser Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Jörn Treustedt, geboren am 16.10.1973 in Neuenhaus, Kreis Grafschaft Bentheim, als erstes Kind von Hanjörg und Luise Treustedt.

Schulbildung:

1980 – 1990	Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Neuenhaus
1990 – 1991	Waiakea High School in Hilo, Hawaii, USA (Schüleraustausch im Rahmen des Congress-Bundestag-Programmes)
1991 – 1993	Oberstufe in Neuenhaus, Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife im Mai 1993

Hochschulbildung:

04/1995 – 12/2001	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
09/1998 – 08/1999	Austauschjahr an der Fakultät der Medizin in Oviedo, Spanien (im Rahmen des Erasmus-Programmes)
11/2000 – 02/2001	1. Tertial des Praktischen Jahres in der Gynäkologie und Geburtshilfe des Hospital Regional de Temuco, Chile
03/2001 – 06/2001	2. Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie und Orthopädie des Kantonsspitals Freiburg, Schweiz
07/2001 – 10/2001	3. Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin des Kreiskrankenhauses Bad Homburg

Weiterbildung:

Seit 03/2002	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Frauenklinik am Inselspital in Bern, Schweiz
--------------	--